



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CAMPUS FLORIANÓPOLIS/ CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS**  
**FISIOLÓGICAS**

Flaviano Lorenzon

**Efeitos da administração gestacional com vitamina D**  
**sobre parâmetros comportamentais e metabólicos em ratos submetidos à**  
**programação fetal pela dexametasona**

Florianópolis

2020

Flaviano Lorenzon

**Efeitos da administração gestacional com vitamina D sobre parâmetros comportamentais e metabólicos em ratos submetidos à programação fetal pela dexametasona**

Tese submetida ao Programa de pós-graduação multicêntrico em ciências fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutor em ciências fisiológicas

Orientadora: Profa. Fernanda Barbosa Lima, Dra.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lorenzon, Flaviano

Efeitos da administração gestacional com vitamina D sobre parâmetros comportamentais e metabólicos em ratos submetidos à programação fetal pela dexametasona / Flaviano Lorenzon ; orientador, Fernanda Barbosa Lima, 2020.  
100 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Ciências Fisiológicas. 2. Vitamina D. 3. Dexametasona. 4. Programação fetal. 5. Metabolismo e comportamento. I. Barbosa Lima, Fernanda. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. III. Título.

Flaviano Lorenzon

**Efeitos da administração gestacional com vitamina D sobre parâmetros comportamentais e metabólicos em ratos submetidos à programação fetal pela dexametasona**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Silvana Auxiliadora da Silva Bordin, Dra

Universidade de São Paulo

Profa. Manuella Pinto Kaster, Dra

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Alex Rafacho, Dr

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em ciências fisiológicas.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Profa. Fernanda Barbosa Lima, Dra.

Orientadora

Florianópolis, 2020.

Este trabalho é dedicado aos meus pais.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo!

Aos meus pais, por terem acreditado nos meus sonhos e por terem me dado todas as bases para realizá-lo.

Aos animais de laboratório, que mesmo sem saber, são essenciais para o desenvolvimento da ciência. Meu respeito e gratidão não seriam suficientes para demonstrar a importância que tiveram para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao João, meu namorado e parceiro de vida, por estar ao meu lado durante toda a pós-graduação.

Aos meus amigos, principalmente a Amanda, que não me permitiram surtar diante de tantos desafios.

À minha orientadora, Professora Dra. Fernanda Barbosa Lima, que com humanidade e maestria me guiou pelo mundo científico. Citando Isaac Newton, “se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”, e eu não poderia ter escolhido gigante melhor!

Agradeço a Tamires, minha melhor amiga, que deixou a pós-graduação muito mais leve com suas gargalhadas e constante bom humor. Agradeço por estar sempre presente, me ajudando, me incentivando, não só nos experimentos, mas também na vida.

À minha amada e doce avó, que mesmo sem saber, me incentivou a ser curioso e questionar sempre.

À Rafaela e Fernanda por todo o auxílio e dedicação oferecidos durante os experimentos, além dos momentos de descontração que são tão importantes quanto os experimentos.

À Luiza e Ricardo que dedicaram parte do seu tempo para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Aos demais membros do LENEC, Ana, Carol, Larissa, Ana Caroline, Jaíne e Josiane, obrigado pela parceria de sempre.

Aos colegas da pós-graduação por terem compartilhado toda sabedoria, experiência e amizade. Especialmente a Karolina Domingues por sempre estar disponível para me ajudar e discutir ciência.

À professora Dra. Cilene Lino de Oliveira por permitir a utilização de seu laboratório onde foi realizado parte dos experimentos.

Ao professor Dr. Alex Rafacho por disponibilizar seu laboratório, insumos e sobretudo o seu tempo e sabedoria.

Ao professor Dr. Wagner Luiz Reis por auxiliar nos procedimentos técnicos que levaram a obtenção dos resultados dessa tese.

Ao professor Dr. Gustavo Jorge dos Santos pelos insumos utilizados nesse trabalho.

Ao programa Bioclin Universidades pela doação de insumos fundamentais para esse trabalho.

Ao corpo técnico do LAMEB pelo auxílio nos experimentos.

À UFSC pelas instalações físicas que possibilitaram a execução deste trabalho.

Às agências de fomento, CNPq e CAPES, pelo suporte financeiro.

“Cada estresse deixa uma cicatriz indelével, e o organismo paga por sua sobrevivência após uma situação estressante envelhecendo um pouco mais”. (Hans Selye, 1907-1982)

## RESUMO

Os glicocorticoides (GC) são usados durante a gestação para prevenir a síndrome do desconforto respiratório e melhorar a viabilidade de neonatos de mães que apresentam risco de parto prematuro. Contudo, a exposição ao GC sintético dexametasona (DEX) durante a gestação tem sido associada com uma programação fetal que pode levar a doenças metabólicas e distúrbios psiquiátricos na idade adulta. A vitamina D (VD) é necessária para o desenvolvimento de vários órgãos, mas também está associada a melhora na homeostase glicêmica e atua com um agente neuro protetor. O objetivo desse estudo foi investigar um possível efeito protetor da administração gestacional com VD sobre parâmetros metabólicos e comportamentais de ratos machos e fêmeas submetidos a programação fetal induzida pela DEX. Ratas Wistar prenhes receberam DEX (0.1mg/kg, DEX) na água de beber diariamente entre o 14º e 19º dia de gestação. Adicionalmente, um grupo de gestantes recebeu administração com VD (500UI, VD) dissolvida em óleo de girassol, diariamente durante toda a gestação. As proles masculina e feminina foram divididas randomicamente em quatro grupos (n=7-10/grupo): CTL, DEX, VD e DVD (DEX + VD). As proles foram estudadas no 3º, 6º e 12º mês pós-natal. Os resultados mostraram que a exposição pré-natal a DEX causou distúrbios metabólicos de um modo dependente da idade e sexo: apenas os machos desenvolveram resistência à insulina, acúmulo de lipídios hepáticos e expansão na massa de células beta pancreáticas. Além disso, demonstramos que a DEX pré-natal promoveu intolerância a glicose em machos e fêmeas e que isso pode estar mais associado a fatores relacionados ao processo de envelhecimento. No contexto comportamental a DEX também promoveu efeitos deletérios em machos e fêmeas, levando ao aumento do comportamento do tipo ansioso, contudo sem prejuízos na memória de trabalho. Nesse contexto, a administração gestacional com VD foi capaz de proteger contra as alterações metabólicas e comportamentais induzidas pela programação fetal. Especificamente, a VD impediu o desenvolvimento de resistência à insulina, evitou o acúmulo de lipídios hepáticos e a expansão na massa de células beta em machos, além de evitar o comportamento do tipo ansioso em machos e fêmeas submetidos à DEX pré-natal. Em conclusão, a administração gestacional com VD pode contribuir como um agente protetor contra os efeitos adversos no metabolismo e comportamento causados pela administração pré-natal de DEX. Apoio financeiro: CNPq e CAPES.

**Palavras-chave:** Vitamina D, programação fetal, dexametasona, glicose, resistência à insulina, ansiedade.

### ABSTRACT

Glucocorticoids have been used in pregnancy to prevent respiratory syndrome and improve the viability of newborns from women presenting the risk of preterm delivery. However, overexposure to the synthetic GC dexamethasone (DEX) during pregnancy has been related to fetal programming that can lead to metabolic and psychiatric diseases during adulthood. Vitamin D (VD) is needed for the development of many organs and contributes to ameliorate the glucose homeostasis by improving insulin releasing. It also can act as a protective agent on the central nervous system. This study aimed to investigate a possible protective role of maternal VD supplementation on metabolic and behavioral parameters in male and female rats submitted to fetal programming induced by DEX. Pregnant Wistar rats received DEX (0.1 mg/kg, DEX) in drinking water daily between the 14<sup>th</sup> and 19<sup>th</sup> days of pregnancy. In addition, some dams received daily oral administration of VD (500UI, VD) dissolved in a vehicle during the whole gestation. Male and female offspring were assigned to four groups (n=7-10/group): CTL, DEX, VD, and DVD (DEX + VD). The offspring was evaluated at 3, 6 and 12 months of age. Results showed that prenatal exposure to DEX caused metabolic disruption in an age and sex-dependent manner: only the male offspring developed insulin resistance, liver lipid accumulation and pancreatic  $\beta$ -cell mass expansion. Furthermore, we demonstrated that prenatal DEX led to glucose intolerance in the male and female offspring and this might be associated with factors related to the aging process. Maternal VD was able to attenuate the disruptions on metabolic and behavioral parameters. Specifically, it prevented the insulin resistance, liver lipid accumulation and  $\beta$ -cell mass expansion in the male offspring prenatally exposed to DEX. Moreover, gestational VD was able to weaken the anxiety-like behavior in males and females prenatally exposed to DEX. In conclusion, maternal VD supplementation seems to contribute as a preventive intervention to reduce adverse metabolic and behavioral effects of prenatal exposure to DEX. Financial support: CNPq and CAPES.

**Keywords:** Vitamin D, fetal programming, dexamethasone, glucose, insulin sensitivity, anxiety.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Peso corporal durante a gestação e ingesta alimentar durante o tratamento com dexametason..... 38
- Figura 2.** Peso ao nascer em machos e fêmeas; peso corporal durante a lactação em machos e fêmeas e peso durante a idade adulta em machos e fêmeas nascidos de mães tratadas com DEX ou não administrado com VD (VD) ou óleo (Veículo).. 40
- Figura 3** Parâmetros desenvolvimentais avaliados pelo dia de abertura bilateral dos olho, dia de aparecimento do reflexo de sobressalto, dia de erupção dos dentes incisivos , dia de aparecimento da penugem e dia de aparecimento do reflexo de preensão palmar de pelos; e avaliação de reflexos de preensão palmar e sobressalto em animais nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrado com VD ou óleo..... 42
- Figura 4.** Reflexo de endireitamento em machos e fêmeas e geotaxia negativa em machos e fêmeas nascidas de mães tratadas com DEX ou não, administrado com VD ou óleo..... 44
- Figura 5.** Valores da glicemia durante o teste de tolerância intraperitoneal a glicose e valores da área sob a curva obtida durante o OGTT em machos nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrado com VD ou óleo ..... 45
- Figura 6.** Valores da glicemia durante o teste de tolerância intraperitoneal a glicose e valores da área sob a curva obtida durante o OGTT em fêmeas nascidas de mães tratadas com DEX ou não, administrado com VD ou óleo ..... 46
- Figura 7.** Valores da glicemia durante o teste de tolerância intraperitoneal a insulina e valores da KITT durante o iITT em machos nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrado com VD ou óleo ..... 47
- Figura 8.** Valores da glicemia durante o teste de tolerância intraperitoneal a insulina e valores da KITT durante o iITT em fêmeas nascidas de mães tratadas com DEX ou não, administrado com VD ou óleo. .... 48
- Figura 9.** Conteúdo de triglicérideo hepático em machos nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrado com VD ou óleo..... 51
- Figura 10.** Conteúdo de triglicérideo hepático em fêmeas nascidas de mães tratadas com DEX ou não, administrado com VD ou óleo..... 52

**Figura 11.** Massa de célula beta em machos com 6 e 12 meses e fêmeas com 6 e 12 meses nascidas de mães tratadas com DEX ou não, administrado com VD ou óleo..... 53

**Figura 12.** Imagens representativas de secções de pâncreas imunocoradas para insulina e contracoradas com hematoxilina, de machos e fêmeas, aos 6 e 12 meses de idade..... 54

**Figura 13.** Latência para entrada nos braços abertos do labirinto, porcentagem de tempo gasto nos braços aberto do labirinto e porcentagem de entrada os braços abertos do labirinto avaliados aos 3, 6 e 12 meses em machos nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrado com VD ou óleo ..... 55

**Figura 14.** Latência para entrada nos braços abertos do labirinto, porcentagem de tempo gasto nos braços aberto do labirinto e porcentagem de entrada os braços abertos do labirinto avaliados aos 3, 6 e 12 meses em fêmeas nascidas de mães tratadas com DEX ou não, administrado com VD ou óleo ..... 56

**Figura 15.** Número de quadrantes percorridos na arena de campo aberto, frequência de entrada nos quadrantes centrais da arena e índice de tigmotaxia avaliados aos 3, 6 e 12 meses em machos nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrado com VD ou óleo..... 59

Figura 16. Número de quadrantes percorridos na arena de campo aberto, frequência de entrada nos quadrantes centrais da arena e índice de tigmotaxia avaliados aos 3, 6 e 12 meses em fêmeas nascidas de mães tratadas com DEX ou não, administrado com VD ou óleo..... 61

**Figura 17.** Tempo de exploração de objetos na sessão de treino, porcentagem de tempo de exploração do objeto desconhecido em relação ao objeto conhecido na sessão de teste 1 e porcentagem de tempo de exploração do objeto desconhecido em relação ao objeto conhecido na sessão de teste 2 aos 3, 6 e 12 meses em machos nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrado com VD ou óleo ..... 65

**Figura 18.** Tempo de exploração de objetos na sessão de treino, porcentagem de tempo de exploração do objeto desconhecido em relação ao objeto conhecido na sessão de teste 1 e porcentagem de tempo de exploração do objeto desconhecido em relação ao objeto conhecido na sessão de teste 2 aos 3, 6 e 12 meses em fêmeas nascidas de mães tratadas com DEX ou não, administrado com VD ou óleo ..... 66

**Figura 19.** Concentração plasmática de corticosterona aos 6 e 12 meses em machos e fêmeas nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrado com VD ou óleo..... 67

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Peso do tecido adiposo omental, perigonadal, perirrenal, peso total das gorduras e concentração de triglicerídeos e colesterol plasmáticos em machos e fêmeas com 6 meses de idade, nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrados com VD ou óleo ..... 49
- Tabela 2.** Peso do tecido adiposo omental, perigonadal, perirrenal, peso total das gorduras e concentração de triglicerídeos e colesterol plasmáticos em machos e fêmeas com 12 meses de idade, nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrados com VD ou óleo ..... 50
- Tabela 3.** Variáveis etológicas avaliadas no LCE. Exploração vertical (EV); Imersão de cabeça (IC) e autolimpeza (AL) em machos e fêmeas com 3 meses de idade, nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrados com VD ou óleo ..... 57
- Tabela 4.** Variáveis etológicas avaliadas no LCE. Exploração vertical (EV); Imersão de cabeça (IC) e autolimpeza (AL) em machos e fêmeas com 6 meses de idade, nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrados com VD ou óleo ..... 57
- Tabela 5.** Variáveis etológicas avaliadas no LCE. Exploração vertical (EV); Imersão de cabeça (IC) e autolimpeza (AL) em machos e fêmeas com 12 meses de idade, nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrados com VD ou óleo ..... 58
- Tabela 6.** Variáveis etológicas avaliadas no campo aberto. Autolimpeza (AL) e exploração vertical (EV) em machos e fêmeas com 3 meses de idade, nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrados com VD ou óleo ..... 63
- Tabela 7.** Variáveis etológicas avaliadas no campo aberto. Autolimpeza (AL) e exploração vertical (EV) em machos e fêmeas com 6 meses de idade, nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrados com VD ou óleo ..... 63
- Tabela 8.** Variáveis etológicas avaliadas no campo aberto. Autolimpeza (AL) e exploração vertical (EV) em machos e fêmeas com 12 meses de idade, nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrados com VD ou óleo. .... 63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACTH</b>	Hormônio adrenocorticotrófico
<b>AgRP</b>	Agouti-related protein
<b>ASC</b>	Área sob a curva
<b>BDNF</b>	do inglês <i>brain derived neurotropic fator</i>
<b>CRF</b>	Hormônio liberador de corticotropina
<b>CRH</b>	Hormônio liberador de corticotrofina
<b>DEX</b>	Dexametasona
<b>GC</b>	Glicocorticoides
<b>GLUT</b>	Glucose transporter
<b>GR</b>	Receptor de glicocorticoides
<b>HHA</b>	Hipotálamo-hipófise-adrenal
<b>IGFs</b>	Fatores de crescimentos semelhantes à insulina
<b>IpGTT</b>	Teste de tolerância intraperitoneal à glicose
<b>IpITT</b>	Teste de tolerância intraperitoneal à insulina
<b>IRS1</b>	Substrato do receptor de insulina
<b>kITT</b>	Constante de decaimento durante o teste de tolerância à insulina
<b>LCE</b>	Labirinto em cruz elevado
<b>NPY</b>	Neuropeptídeo Y
<b>PEPCK</b>	Fosfoenolpiruvato carboxicinase
<b>POMC</b>	Proopiomelanocortina
<b>PPAR</b>	Peroxisome proliferator-activated receptor
<b>PVN</b>	Núcleo paraventricular do hipotálamo
<b>VD</b>	Vitamina D
<b>VDR</b>	Receptor de vitamina D

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1. Gestação e glicocorticoides.....	17
1.2. Efeitos Neurais .....	19
1.3. Efeitos Metabólicos.....	20
1.4. Gestação e vitamina D.....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
2.1. Objetivo geral .....	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
3.1. Protocolo de acasalamento.....	26
3.2. Tratamento com dexametasona e administração com vitamina D3 .....	26
3.3. Grupos experimentais .....	27
3.4. Avaliação do desenvolvimento da prole durante a lactação. ....	28
3.4.1. Desenvolvimento físico .....	28
3.4.2. Desenvolvimento de reflexos.....	28
3.4.3. Avaliação do peso corporal .....	29
3.5. Avaliação dos parâmetros metabólicos .....	29
3.5.1. Teste de tolerância intraperitoneal à glicose (ipGTT) .....	29
3.5.2. Teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ipITT) .....	29
3.5.3. Conteúdo hepático de triglicerídeo .....	30
3.5.4. Análise imunohistoquímica .....	30
3.5.5. Análises bioquímicas .....	31
3.6. Avaliação dos parâmetros comportamentais. ....	32
3.6.1. Labirinto em cruz elevado .....	32
3.6.2. Campo aberto.....	33
3.6.3. Reconhecimento de objetos .....	33
3.7. Dosagem de corticosterona .....	34
3.8. Análise dos vídeos .....	35
3.9. Eutanásia e extração de órgãos .....	35
3.10. Análise estatística.....	36
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>

4.1.	Parâmetros desenvolvimentais.....	37
4.1.1.	Peso corporal durante a gestação e ingesta alimentar durante o tratamento com dexametasona.....	37
4.1.2.	Peso corporal no dia do nascimento, durante a lactação e na vida adulta .....	38
4.1.3.	Desenvolvimento físico e de reflexos da prole .....	41
4.2.	Parâmetros metabólicos .....	44
4.2.1.	Teste de tolerância intraperitoneal a glicose na prole adulta .....	44
4.2.2.	Teste de tolerância intraperitoneal a insulina na prole adulta .....	46
4.2.3.	Massa de tecido adiposo branco na prole adulta .....	48
4.2.4.	Parâmetros bioquímicos .....	50
4.2.5.	Massa de células beta .....	53
4.3.	Parâmetros comportamentais .....	54
4.3.1.	Teste de labirinto em cruz elevado .....	54
4.3.2.	Teste de campo aberto .....	58
4.3.3.	Teste de reconhecimento de objetos .....	64
4.4.	Dosagem hormonal.....	66
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
5.1.	Parâmetros desenvolvimentais.....	68
5.2.	Parâmetros metabólicos .....	71
5.3.	Parâmetros comportamentais .....	76
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>82</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>99</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Gestação e glicocorticoides

A gravidez é um processo fisiológico natural em que ocorrem adaptações no corpo da mulher desde o momento da fertilização. O preparo do organismo para a gestação compreende ajustes dos mais variados sistemas, incluindo o sistema nervoso central e endócrino. A regulação precisa da síntese e liberação hormonal durante a gestação é fundamental para o correto desenvolvimento fetal, sendo que qualquer mudança nos níveis normais desses hormônios pode induzir alterações tanto a nível microscópico quanto macroscópico no feto (Owen *et al.*, 2007).

Eventos adversos durante a gestação, tais como cuidado materno alterado, estresse ou administração exógena de glicocorticoides (GC) podem alterar o desenvolvimento do feto refletindo em alterações orgânicas e comportamentais na prole ao longo da vida (van Bel e Heijnen, 2009). Naturalmente o feto encontra-se protegido das ações dos níveis elevados de GC durante a gestação devido à presença placentária da enzima denominada 11  $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase 2, responsável pela inativação do cortisol materno. Porém, os GC sintéticos, como a dexametasona (DEX) ou a betametasona, ligam-se muito fracamente a essa enzima, fazendo com que os mesmos não sofram alterações e passem para a circulação fetal (Bruschettini *et al.*, 2006), tornando o feto suscetível às alterações provocadas pelo excesso de GC.

Os GC, hormônios esteroides sintetizados pelo córtex das glândulas adrenais, predominantemente cortisol em humanos e corticosterona em roedores, possuem efeitos clássicos no metabolismo dos substratos energéticos, carboidratos, lipídios e proteínas, principalmente no fígado e tecido adiposo (Schimmer e Funder, 2011). Além dessa ação clássica, os GC influenciam também no metabolismo mineral, reduzindo a absorção intestinal e aumentando a excreção renal de cálcio. De fato, o excesso de GC está associado ao desenvolvimento de osteoporose e aumento na incidência de fraturas ósseas por ativar precocemente genes envolvidos na osteoclastogênese e inibir a osteogênese (Yao *et al.*, 2008).

Os GC, endógenos e exógenos, possuem também ação anti-inflamatória e imunossupressora, agindo por meio da indução ou repressão da transcrição gênica (Rhen *et al.*, 2005; Stahn e Buttgerit, 2008), reduzindo as respostas celulares e vasculares do

processo inflamatório (Rhen *et al.*, 2005; Stahn e Buttgereit, 2008), o que tem feito deles importantes fármacos no controle da resposta inflamatória exacerbada, vista em diversos quadros patológicos, incluindo o tratamento de pacientes com COVID-19 que necessitam ventilação mecânica (RECOVERY Collaborative Group, 2020).

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) regula a produção e liberação dos corticosteroides em condições basais e sob influência de estímulos estressores. O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) sintetiza e libera o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e vassopressina. Esses hormônios estimulam a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pelos corticotropos da pituitária anterior, que por sua vez promovem a produção e liberação de cortisol (em humanos) e corticosterona (em roedores) pelo córtex das glândulas adrenais (Ulrich e Herman, 2009).

A maior parte do cortisol liberado pelas adrenais (90%) circula no plasma ligado a albumina ou a globulina ligante de corticosteroide (transcortina, SERPINA6) (Coolens *et al.* 1987), enquanto o cortisol remanescente atravessa facilmente a membrana plasmática das células e liga-se ao receptor de GC (*Glucocorticoid Receptor-GR*), um fator de transcrição ativado pelo ligante. Os GC possuem amplos efeitos nos sistemas nervoso, cardiovascular, imune, respiratório, reprodutivo e tegumentar, [para revisão ver (Sapolsky *et al.*, 2000; Kadmiel e Cidlowski 2013; Sacta *et al.*, 2016)].

Devido ao amplo efeito ocasionado pela ativação dos receptores de glicocorticoides (GR), sintéticos como DEX, prednisona, hidrocortisona e budesonida são frequentemente prescritos para o tratamento de patologias como psoríase, eczema, inflamações (Kadmiel e Cidlowski, 2013) e leucemias (Lin e Wang, 2016), sendo também, indicados para a imunossupressão após transplantes de órgãos (Coutinho e Chapman, 2011). Contudo, pela alta afinidade aos GR, os GC sintéticos mimetizam um efeito de exposição em longo prazo a altos níveis de GC, resultando em severos efeitos colaterais como hipertensão, diabetes *mellitus*, glaucoma e osteoporose (Schäcke *et al.*, 2002).

Apesar de todas as ações supracitadas, os GC são criticamente necessários para o desenvolvimento fetal. Em muitas espécies de mamíferos ocorre um pico na secreção de GC na circulação durante o final da gestação, o qual é necessário para maturação normal dos pulmões, promovendo a produção do surfactante pulmonar. Contudo, o pico de GC também é fundamental para o desenvolvimento de outros órgãos e sistemas como a

tireoide, rins, cérebro e hipófise (Fowden e Forhead, 1998), sendo essencial que esse pico ocorra durante o estágio preciso da maturação, do contrário, a trajetória no desenvolvimento pode ser alterada. O excesso de GC durante a gestação ou ainda durante estágios incorretos da maturação leva a alterações no desenvolvimento, resultando em funções fisiológicas alteradas e, em algumas situações, patologias (Matthews, 2000; Kapoor, Petropoulos e Matthews, 2008).

## 1.2. Efeitos Neurais

A exposição pré-natal a excesso de GC altera o desenvolvimento de funções cardiovasculares, metabólicas, reprodutivas e neurológicas de muitas espécies de mamíferos, incluindo humanos (Chapman, Holmes e Seckl, 2013; Braun *et al.*, 2013), além de inibir o crescimento fetal (Fowden e Forhead, 1998) e diminuir a expressão de fatores de crescimento semelhantes a insulina (IGFs) (Gatford, 2008). Além disso, a exposição pré-natal a GC não só altera o desenvolvimento e subsequente função do eixo HHA ao longo da vida (Diaz *et al.*, 1998), mas também causa alterações centrais como sensibilidade a dopamina e da atividade serotoninérgica (Slotkin *et al.*, 2006). Estas ações criam um elo entre as experiências do início da vida e o desenvolvimento de doenças crônicas mais tardiamente (Reynolds, 2013) como síndrome metabólica e diversos transtornos psiquiátricos (Harris e Seckl, 2011; Santos e Joles, 2012; Barella, Estringer e Wadhwa, 2013; de Oliveira e Mathias, 2014;).

A hipercortisolemia aumenta a suscetibilidade a várias doenças, inclusive a depressão (Di Dalmazi *et al.*, 2012). No cérebro, o excesso de GC causa declínio cognitivo, associado com degeneração de neurônios do hipocampo, atrofia dendrítica e perda sináptica (Popoli *et al.*, 2012; Hunter *et al.*, 2012), além de prejudicar a neurogênese no sistema límbico, o que pode ser uma das causas da depressão (Banar *et al.*, 2011)

Ratos e camundongos expostos a GC no período pré-natal mostram aumento na latência para encontrar a plataforma oculta no labirinto aquático de Morris, um teste para aprendizagem espacial e memória (Noorlander *et al.* 2008; Hauser, Feldon e Pryce, 2009). Em camundongos, a exposição pré-natal a GC também está associada à redução na proliferação de neurônios no giro denteado, um sub-região do hipocampo onde ocorre a neurogênese no adulto, e ao aumento de apoptose no hipocampo de ratos (Noorlander *et al.* 2008 e Zuloaga, 2012). Adicionalmente, pesquisas com ratos também mostram aumento nos comportamentos do tipo depressivo e do tipo ansioso em ratos juvenis e

adultos submetidos ao tratamento pré-natal com GC (Nagano, Ozawa e Suzuki, 2008; Hauser, Feldon e Pryce, 2009).

Interessantemente, trabalhos com babuínos e porcos da Guiné, mostram aumento no comportamento do tipo ansioso à exposição pré-natal a GC na prole feminina, resposta essa não vista na prole masculina (Rodriguez *et al.* 2011 e Owen *et al.*, 2007). Corroborando esses resultados, Hiroi e colaboradores (2016), avaliaram ansiedade e depressão em ratos submetidos ao tratamento pré-natal com DEX e demonstraram que apenas as fêmeas apresentaram comportamento do tipo ansioso e depressivo aumentado, levando a concluir que fêmeas são mais suscetíveis as algumas alterações comportamentais induzidas pela exposição pré-natal aos GC.

### **1.3. Efeitos Metabólicos**

A exposição aos GC durante o período final da gestação aumenta a atividade da enzima hepática fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK), enzima limitante da gliconeogênese, o que pode causar alterações na homeostase glicêmica (Franko *et al.*, 2010). Além disso, Dalziel e colaboradores (2005), demonstraram que a exposição pré-natal a betametasona em humanos pode resultar em resistência à insulina aos 30 anos de idade. Já em ratos, administração de DEX no período pré-natal altera a expressão gênica relacionada ao desenvolvimento pancreático e reduz a massa de células  $\beta$ -pancreáticas na prole 120 dias após o nascimento (Chen *et al.* 2016). A exposição pré-natal aos GC pode ocasionar ainda a elevação permanente da glicemia da prole na fase adulta, redução do “pool” de células  $\beta$ - pancreáticas e restrição do crescimento fetal (Lindsay *et al.* 1996a, Nyirenda *et al.* 1998). Estes efeitos estão relacionados com hiperinsulinemia e aumento na expressão de mRNA e atividade da enzima hepática PEPCK (Nyirenda *et al.* 1998), sugerindo que o aumento na produção hepática de glicose pode contribuir para o aumento na glicemia. Interessantemente as alterações observadas na homeostase glicêmica parecem acontecer, predominantemente, quando o GC é administrado na última semana da gestação, sugerindo que esse seja o período crítico para que ocorra a programação fetal pelos GC, levando à elevação da glicemia na fase adulta (Nyirenda *et al.* 1998, Pantaleão *et al.* 2017; Payolla *et al.* 2019).

#### 1.4. Gestação e vitamina D

A depressão é comumente associada à hiperatividade do eixo HHA induzida por estímulos estressores, o que acarreta o aumento nos níveis circulantes de GC (Guidotti *et al.*, 2013). O hipercortisolismo, por sua vez, contribui para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e osteoporose em resposta ao estresse cr nico (Michelson, 2009). Devido à clássica função sobre a homeostase do metabolismo do cálcio e f sfato, a VD é frequentemente usada como coadjuvante no tratamento para osteoporose induzida por GC (Compston, 2010). Além disso, a VD tem sido reconhecida como um hormônio pluripotente com ações neurais capazes de impedir a atrofia neural causada por GC (Obradovic *et al.*, 2006).

A VD é um secosteroide conhecido classicamente por atuar na homeostase do cálcio e f sfato. O nome “vitamina” tem sido empregado erroneamente, visto que sua obtenção dietética corresponde a menos de 5%, cabendo ao organismo a síntese dos outros 95% (Nandi *et al.* 2016). O 7-deidrocolesterol, precursor da VD, sofre cisão na pele por ação dos raios UVB do sol, convertendo-o em colecalciferol (vitamina D3), que   então transportado no plasma associado   proteína ligadora de VD e posteriormente sofre duas hidroxilações promovidas por oxidases de função mista. A primeira hidroxilação ocorre no fígado sob ação das enzimas CYP27A1 (mitocondrial) e CYP2R1 (microssomal) dando origem ao 25-hidroxicolecalciferol (calcidiol). A segunda hidroxilação ocorre nos túbulos contorcidos proximais dos rins, onde a enzima CYP27B1 hidroxila o calcidiol em 1,25-diidroxicolecalciferol (calcitriol) que é a molécula metabolicamente ativa e com ações hormonais.

As ações biológicas da VD são mediadas pelo seu receptor (VDR, *vitamin D receptor*), um fator de transcrição que pertence à família de receptores hormonais nucleares 1. O VDR é expresso em praticamente todos os tecidos humanos e participa, direta ou indiretamente, de modulação de cerca de 900 genes (3% do genoma humano) (Bouillon *et al.* 2008). Poucas células não apresentam VDR, entre elas, as hemácias e algumas células do sistema nervoso central, como as células de Purkinje e os neurônios do setor CH4 do prosencéfalo basal (Bouillon *et al.* 2008).

Classicamente a VD atua em três órgãos: intestino, ossos e glândulas paratireoides. No intestino a VD entra nos enterócitos e promove aumento na síntese da calbidina D9K facilitando o transporte de cálcio através dos enterócitos,

consequentemente aumentando a absorção de cálcio (Bouillon, 2015). Nos ossos ela estimula a osteoclastogênese bem como a reabsorção óssea (Bringham, Demay e Kronenberg, 2011). Nas glândulas paratireoides, a deficiência de VD estimula a síntese do paratormônio, que por sua vez estimula a expressão da CYP27B1 aumentando a síntese do calcitriol (Premaor *et al.*, 2008).

A VD é bem conhecida pela sua função sobre a densidade mineral óssea (Holick, 2007), contudo, concentrações ótimas de VD são necessárias para a função cerebral pelo seu papel na sinalização pelo cálcio, ações neurotróficas e neuroprotetoras, além da sua função na maturação, diferenciação e crescimento neuronal (Groves, McGrath, Burne, 2014).

Estudos recentes mostram a expressão de VDR em diversos tecidos, incluindo pâncreas, coração, células do sistema imunológico, músculo esquelético, e sistema nervoso central (Veenstra *et al.*, 1998; Di Rosa *et al.*, 2008; Eyles *et al.*, 2014). Interessantemente a expressão de VDR também foi demonstrada ao longo de todo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG) o que sugere uma influência da VD na função reprodutiva (Eyles *et al.*, 2003; Wrzosek *et al.*, 2013), incluindo a gestação e desenvolvimento fetal.

A deficiência de VD durante a gestação é definida por níveis séricos menores que 50nmol/L e abrange de 20% a 85% das mulheres, dependendo do país onde vivem, estação do ano, latitude, entre outros fatores (Dawodu e Wagner, 2007). Isso pode expor a gestante ao risco aumentado de desenvolver alterações metabólicas como resistência a insulina e diabetes gestacional, podendo evoluir para diabetes do tipo 2 (Joham *et al.*, 2016) e depressão pós-parto (Hosseini-Nezhad e Holick, 2013). Um estudo *in vitro* demonstrou que a VD modula a secreção de insulina por se ligar a VDR nas células  $\beta$ -pancreáticas, contudo os mecanismos envolvidos nessa modulação ainda não são conhecidos [para revisão (Zhang *et al.*, 2015)]. Além disso, o desenvolvimento fetal pode ser influenciado pela deficiência de VD durante a gestação. Estudos mostram que a deficiência de VD causa redução do peso do recém-nascido, desenvolvimento anormal do esqueleto fetal e aborto (Baker *et al.*, 2010; Paffoni *et al.*, 2014).

Em humanos a deficiência gestacional de VD foi associada com baixo desenvolvimento mental e psicomotor dos filhos (Zhu *et al.*, 2015) bem como déficit cognitivo em crianças australianas (Hart *et al.*, 2015). Os mecanismos envolvidos no

desenvolvimento cognitivo mediado pela VD durante a gestação ainda não são claros. Contudo a VD parece ativar uma variedade de sistemas de transdução de sinal incluindo o influxo do íon cálcio, liberação de cálcio das reservas intracelulares, modulação da adenilato ciclase, fosfolipase C, proteína cinase C, proteína cinase D e MAP cinase (Harms *et al.*, 2011; Shipton e Shipton, 2015), podendo isso interferir nos sistemas de uma variedade de neurotransmissores como acetilcolina, serotonina e dopamina (Cass *et al.*, 2012; Patrick e Ames, 2012; Lundwall *et al.*, 2015). A desregulação nos sistemas desses neurotransmissores pode ocasionar transtornos psiquiátricos, neurocognitivos e neuromotores como esquizofrenia, transtornos afetivos, ansiedade e autismo em humanos (Kinney *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2013; Dean, Copolov e Scarr, 2016; Bandelow *et al.*, 2016).

Por outro lado, a administração com VD durante a gestação reduz a população de células TCD4+, citocinas inflamatórias, pressão arterial e morte fetal em um modelo animal de pré-eclâmpsia (Faulkner *et al.*, 2016). Adicionalmente a administração materna com VD em humanos aumenta o peso dos neonatos ao nascimento bem como reduz o risco de diabetes gestacional (Kalra *et al.*, 2012; Hossain *et al.*, 2014), evidenciando assim o possível efeito benéfico da administração com VD tanto na prole quanto nas gestantes, no que tange a algumas alterações fisiológicas.

Jiang e colaboradores, 2014 demonstraram que o excesso de GC pode ocasionar desregulação no metabolismo renal da VD, além de alterar o metabolismo local da VD no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos, fornecendo evidências do envolvimento da VD na coexistência de depressão induzida pelo excesso de GC. Além disso, Obradovic e colaboradores (2016) demonstraram que a VD não só reduz a expressão de receptores para GC mas também inibe a translocação destes para o núcleo de células sanguíneas mononucleadas (Hidalgo *et al.*, 2011).

Considerando o importante papel da VD na transdução de sinais e as ações recíprocas entre os sistemas da VD e de GC, o presente estudo testou as seguintes hipóteses: 1) a administração de DEX no terço final da gravidez leva a déficits neurais relacionados à cognição, memória e desordens de humor na prole; 2) a administração de VD durante todo o período gestacional será capaz de prevenir ou pelo menos atenuar os déficits neurais provocados pela DEX na prole; 3) a administração de VD durante todo o período gestacional será capaz de prevenir ou ao menos atenuar as já conhecidas

desordens metabólicas provocadas pela DEX na prole; e 4) existem diferenças sexo-específicas e tempo-dependentes na susceptibilidade das proles aos efeitos da DEX, bem como nas respostas à administração de VD.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar se a administração gestacional com VD é capaz de atenuar os efeitos da programação fetal induzida pela administração de DEX no terço final da gestação sobre parâmetros desenvolvimentais, metabólicos e comportamentais da prole. Ainda, avaliar se há dimorfismo sexual nas alterações observadas.

### **2.2. Objetivos específicos**

Avaliar se a exposição pré-natal à DEX promove alterações sexo-dependentes aos 3, 6 e 12 meses pós-natal:

- No desenvolvimento físico e neural;
- No peso corporal;
- Na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina;
- Na massa de células beta pancreáticas;
- No acúmulo de lipídios hepático;
- No perfil lipídico plasmático;
- Na concentração plasmática de cálcio;
- No comportamento do tipo ansioso;
- Na memória de trabalho;

Além disso, para todos os objetivos supracitados, investigar se a administração gestacional com VD previne ou atenua as possíveis alterações encontradas.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização dos protocolos experimentais, foram utilizados ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os roedores foram alojados em caixas de polipropileno (30 x 19 x 13 cm), forradas com maravalha, dispostas de água e ração *ad libitum*, permanecendo no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas, com temperatura controlada ( $21 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e ciclo claro-escuro invertido de 12 horas (luzes acesas às 18:00 e apagadas às 6:00). Três vezes durante a semana, no período da manhã, as caixas foram higienizadas, havendo reposição de água e alimento. Os protocolos e procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina – N° 7174170417.

#### 3.1. Protocolo de acasalamento

Com o objetivo de obter as gestantes e proles para a execução dos experimentos, o protocolo de acasalamento utilizou animais com idade entre 80 e 100 dias, sendo as fêmeas com peso  $\geq 180$  gramas e os machos entre 200 e 350 gramas. Cinco dias antes do acasalamento as gaiolas foram pareadas de modo que as fêmeas ficassem ao lado das gaiolas dos machos. Após o pareamento, três fêmeas e um macho foram postos em uma caixa, iniciando o acasalamento. Na manhã seguinte, as fêmeas que apresentaram espermatozoides e células queratinizadas no lavado vaginal foram alocadas em outra caixa, sendo contado como dia 0 da gestação. O procedimento foi repetido por dez dias (dois ciclos estrais completos das ratas). As gestantes permaneceram alojadas, três por caixa, até o 13° dia de gestação, quando então foram remanejadas e alocadas uma por gaiola. O sucesso reprodutivo foi de 78% (39 de 50 ratas engravidaram) e a relação machos/fêmeas foi de aproximadamente 1:1.

#### 3.2. Tratamento com dexametasona e administração com vitamina D3

A administração de dexametasona (DEX, Decadron®) ocorreu do 14° ao 19° dia gestação, na dose de 0,1 mg/kg (Tsai *et al.* 2019) diluída na água de beber. Nesse período as gestantes foram mantidas em gaiolas individuais, para controle da ingestão alimentar e dosagem do fármaco. Um dia antes do início do tratamento com DEX o volume de água ingerido foi mensurado para diluição adequada do fármaco. Foi realizado um cálculo levando-se em conta a concentração do fármaco, peso do animal e volume de água

ingerida. O volume foi corrigido para 200 mL de água, para caso ocorresse uma ingestão maior do que a do dia anterior, não faltasse água para os animais. Do 14º ao 19º dia de gestação a quantidade de água ingerida foi mensurada e trocada diariamente, adequando-se a concentração de DEX de acordo com o volume hídrico ingerido um dia antes da administração.

A VD foi administrada na forma de vitamina D3 (colecalfiferol, Organic Compauding) por via oral/gavagem na dose de 500UI/dia durante todo o período gestacional, diluídos em 0,4mL de óleo de girassol, iniciando no dia 1 até o dia 20. Os grupos controles receberam, via gavagem, óleo de girassol, 0,4mL por animal.

### **3.3. Grupos experimentais**

No dia do nascimento, os animais foram sexados, pesados e medidos individualmente. Com objetivo de evitar o efeito do tamanho da ninhada nos parâmetros metabólicos e comportamentais a serem analisados, as ninhadas foram reduzidas à 8 filhotes por mãe, quando possível 4 machos e 4 fêmeas. No final da lactação, 21º dia após o nascimento, para evitar efeitos estatísticos da ninhada, apenas dois machos e duas fêmeas foram utilizados para composição dos grupos experimentais, sendo um macho e uma fêmeas para compor os grupos estudados com 3 e 6 meses de idade e os outros para comporem os grupos estudados com um ano de idade.

As gestantes foram divididas em quatro grupos experimentais de acordo com o tratamento que receberam: apenas veículo (CTL); dexametasona (DEX), dexametasona mais vitamina D (DVD); apenas vitamina D (VD). As proles foram divididas nos mesmos grupos, mas levando em consideração apenas os tratamentos que as mães receberam durante a gestação e também de acordo com o sexo. Sendo assim, obtivemos proles de machos e fêmeas dos seguintes grupos experimentais:

CTL: animais nascidos de mães que receberam apenas veículo.

DEX: animais nascidos de mães que receberam apenas DEX.

VD: animais nascidos de mães que receberam apenas vitamina D.

DVD: animais nascidos de mães que receberam DEX + vitamina D.

As proles foram estudadas durante o período de lactação e na vida adulta aos 3, 6 e 12 meses de idade. É importante frisar que neste estudo, as proles não foram submetidas diretamente a nenhum tratamento.

### **3.4. Avaliação do desenvolvimento da prole durante a lactação.**

#### **3.4.1. Desenvolvimento físico**

Para avaliação do desenvolvimento físico da prole, foram observados os dias de nascimento dos pelos, dia de abertura dos olhos e dia de erupção dos dentes incisivos. A avaliação foi feita por meio de observações diretas e diárias de cada filhote como segue abaixo:

- Erupção dos dentes incisivos: avaliada entre os dias 6 e 12 após o nascimento. A boca do animal foi cuidadosamente aberta e então observou-se o dia exato em que aconteceu o aparecimento do esmalte dos dentes incisivos inferiores e superiores;
- Abertura dos olhos: esta observação foi realizada entre os dias 10 e 15 após o nascimento e foi registrado o dia da ocorrência da primeira fresta da abertura bilateral dos olhos;
- Nascimento da penugem: realizada entre os dias 2 e 8 após o nascimento e então registrou-se o dia em que a penugem apareceu.

#### **3.4.2. Desenvolvimento de reflexos**

A avaliação do desenvolvimento dos reflexos permite identificar possíveis alterações neurológicas no início da vida do animal. Foram realizados testes diários até que 100% dos filhotes apresentassem os seguintes reflexos e comportamentos:

- Reflexo de endireitamento: Este teste foi feito na prole do 5º ao 8º dia após o nascimento. O animal foi colocado em decúbito dorsal e então avaliou-se a latência para que o animal virasse o corpo para posição de decúbito ventral. Considerou-se que, ao virar-se, o animal deveria estar com as quatro patas espalmadas na superfície. No dia em que todos os animais apresentaram o reflexo, foi então avaliada a latência para execução do mesmo. O período de latência máximo para este teste foi de 30 segundos.
- Reflexo de geotaxia negativa: este teste foi realizado no 7º, 9º, 11º e 13º dias após o nascimento. Para isso os animais foram colocados em uma rampa com uma inclinação aproximada de 45º, a 5 cm do final inferior da rampa, com a cabeça direcionada para

baixo e avaliou-se a ocorrência ou não da resposta de virar o corpo para a posição oposta, (cabeça direcionada para cima). No dia em que todos os animais apresentaram o reflexo, foi então avaliada a latência para sua ocorrência.

- Reflexo de sobressalto: este teste foi realizado do 11º ao 14º dia após o nascimento. Isoladamente, cada filhote foi exposto a um estalido curto e seco (Ruído de luva de látex sendo esticada e solta no dorso da mão) para observação da maturidade do sistema auditivo e neurológico. Foi avaliado o dia em que os animais apresentaram um tremor generalizado em resposta ao ruído.

### **3.4.3. Avaliação do peso corporal**

O peso corporal dos animais foi avaliado ao nascer e a cada 4 dias durante a lactação. Depois disso, os animais foram pesados mensalmente a partir do segundo mês pós-natal até o período final do experimento, ou seja, até que atingissem um ano de idade..

## **3.5. Avaliação dos parâmetros metabólicos**

### **3.5.1. Teste de tolerância intraperitoneal à glicose (ipGTT)**

O teste foi realizado aos 3, 6 e 12 meses de idade nos animais em jejum de 08-10h e acordados. Os animais tiveram a extremidade da cauda seccionada (após assepsia e anestesia tópica com lidocaína 5%) para a coleta de 2 gotas de sangue. A primeira gota foi descartada e a segunda utilizada para determinação da glicemia no tempo zero utilizando um glicosímetro (Accu-Check® Performa; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). Imediatamente após a verificação da glicemia no tempo zero, uma solução de glicose 50% (2 g/kg de peso corpóreo, ip.) foi administrada e amostras de sangue da cauda dos ratos aos 30, 60 e 120 min foram coletadas para determinação das concentrações de glicose sanguínea e posterior cálculo da área sob a curva.

### **3.5.2. Teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ipITT)**

O ipITT foi realizado aos 3, 6 e 12 meses de idade em animais alimentados e acordados. Os animais tiveram a extremidade da cauda seccionada (após assepsia e anestesia tópica com lidocaína 5%) para a coleta de 2 gotas de sangue. A primeira gota foi descartada e a segunda utilizada para determinação da glicemia no tempo zero utilizando um glicosímetro, como descrito acima. Na sequência, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de insulina humana recombinante (Biohulin®) equivalente a

1 UI/kg de peso corpóreo. Amostras de sangue foram coletadas para dosagem da glicemia nos tempos 10, 20, 30 e 45 min. A constante de decaimento de glicose (KITT) foi calculada a partir do declínio da linha de regressão obtida com valores de glicose log-transformados na fase linear de decaimento da glicose sanguínea.

### 3.5.3. Conteúdo hepático de triglicerídeo

Os fígados dos animais com 6 e 12 meses foram extraídos, pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C para posterior quantificação do conteúdo de triglicerídeos. Amostras de fígado do lobo caudado (100mg) foram transferidas para um tubo de ensaio contendo 0.7 mL de NaCl a 1M e homogeneizadas com o homogeneizador T18 UltraTurrax® (IKA®; Staufen, Alemanha). Logo após a homogeneização, 2 mL de solução de metanol/clorofórmio (1:2, v/v) foi adicionado ao tubo e centrifugados por 30 minutos a 4000 rpm (Eppendorf 5810R). A fase metanólica foi separada em outro tubo de ensaio e então postos em banho maria a 98 °C para evaporação do solvente. Uma solução de metanol/Triton 100 (1:2, v/v) foi adicionado às amostras para quantificação do conteúdo hepático de triglicerídeos utilizando ensaio colorimétrico, seguindo as orientações do fabricante (Bioclin).

### 3.5.4. Análise imunohistoquímica

Para mensuração da massa das células  $\beta$ , o pâncreas dos animais com 6 e 12 meses foi extraído tendo os linfonodos e tecido adiposo removidos para posterior pesagem do órgão. A porção esplênica do pâncreas foi selecionada e o tecido foi fixado em paraformaldeído 4% por 24h em temperatura ambiente. Posteriormente foram desidratados e embebidos em parafina. Duas secções no maior plano do tecido (5 $\mu$ m) foram obtidas em micrótomo rotativo e aderidas em lâminas sinalizadas individuais. As secções foram desparafinizadas, reidratadas, lavadas com tampão fosfato, PBS (pH 7,4) e incubadas com solução de citrato de sódio 10mM (pH 6) aquecida e mantida a 98 °C em banho-maria por 30 min para recuperação antigênica. Na sequência as secções foram novamente lavadas com PBS e uma solução de peróxido de hidrogênio (0,3%) foi usada para bloquear a atividade da peroxidase endógena antes da permeabilização com PBS contendo Tween-20 (0,1%) e bloqueio com albumina bovina (5%) em temperatura ambiente.

Após o bloqueio, as secções foram lavadas com PBS e então, imunocoradas por incubação com anticorpo primário policlonal anti-insulina feito em *guinea pig* (1:400;

Dako North America, Inc.; cat. no. A0564) diluído em PBS contendo albumina bovina a 3% *overnight* a 4°C. No dia seguinte as secções foram lavadas com PBS e incubadas, por 2h em temperatura ambiente com anticorpo HRP-conjugado anti-*guinea pig* (1:1000; Invitrogen; cat. no. 614620). Células positivas para insulina foram detectadas com solução de 3,3'-diaminobenzidina (Sigma Chemical). Na sequência, as secções foram coradas com hematoxilina de Ehrlich e posteriormente escaneadas utilizando um scanner automático (AxioScan, ZEISS, Oberkochen, Alemanha) para posterior análise.

As imagens obtidas pelo AxioScan, a mensuração da área total do pâncreas e a área total imunomarcada para insulina nas ilhotas relativo à porção esplênica analisada, foi realizado pelo software Image J (Fiji). A determinação da massa relativa de células beta foi calculada pelo percentual de células beta por área analisada multiplicando-se pela massa total do pâncreas, e em seguida normalizada pelo peso de cada animal, resultando na massa de células  $\beta$  em mg/100g de peso corpóreo. As imagens representativas foram obtidas em microscópio invertido (OLYMPUS; Tokyo, Japan).

### **3.5.5. Análises bioquímicas**

A glicemia foi mensurada nos animais com jejum de 8-10h aos 3, 6 e 12 meses de vida, durante o teste de tolerância a glicose, por meio do sistema de fitas (monitor digital) “Accu-Check Performa” (ROCHE, Brasil). A mensuração foi realizada a partir de uma gota de sangue obtida pela secção da ponta da cauda do animal após anestesia tópica com lidocaína 5%.

A quantificação das concentrações plasmáticas de triglicerídeo, colesterol e cálcio foram realizadas após a eutanásia dos animais com 6 e 12 meses de idade. Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca no dia da eutanásia. O plasma foi armazenado para posterior mensuração das concentrações plasmáticas de triglicerídeos (triglicerídeos monoreagente K117-2; Bioclin, Brasil), colesterol total (colesterol monoreagente K083-2; Bioclin, Brasil) e cálcio (cálcio arzenato III K051; Bioclin, Brasil) usando kits comerciais e seguindo as instruções do fabricante.

### **3.6. Avaliação dos parâmetros comportamentais.**

#### **3.6.1. Labirinto em cruz elevado**

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um modelo amplamente utilizado na pesquisa para avaliar o comportamento do tipo ansioso em ratos e camundongos, e se baseia em respostas incondicionadas a ambientes que possam oferecer perigo em potencial. O LCE consiste em um aparato elevado 60 cm do chão, composto por quatro braços posicionados em direções opostas, dois fechados e dois abertos (posicionados perpendicularmente, formando uma cruz simétrica, sendo cada braço com 50 centímetros de comprimento e 10 centímetros de largura.

Esse teste é derivado do trabalho de Montgomery (1955) e o princípio básico do teste se baseia na premissa de que ambientes novos provocam medo e curiosidade, criando assim, um típico conflito de aproximação/esquiva. Foi demonstrado que ratos apresentam alto grau de exploração de espaços fechados em comparação aos abertos (Rodgers, 1992; Rodgers *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1997). Já é estabelecido pela literatura que ansiolíticos clássicos podem aumentar a exploração dos braços abertos, sem interferir com a atividade motora (Pellow *et al.*, 1985). Por outro lado, fármacos que diminuem as entradas nos braços abertos do aparato são caracteristicamente ansiogênicas (Carobrez e Bertoglio, 2005)

Este teste foi realizado aos 3, 6 e 12 meses de vida. Cada animal foi posicionado no centro da plataforma de frente para um braço fechado. O animal permaneceu durante 5 minutos no aparato, livre para exploração do local, sendo os comportamentos registrados por vídeo para posterior análise. Após a exposição de 5 minutos, o animal foi retirado do aparato e devolvido para sua caixa. O labirinto foi higienizado com álcool 20%, evitando assim pistas odoríferas para o próximo animal que foi submetido ao teste. Os comportamentos foram gravados por 5 min e analisados posteriormente usando o software EthoWatcher®.

As variáveis comportamentais foram divididas em espaço-temporais e etológicas. As variáveis espaço-temporais avaliadas foram: porcentagem de entradas nos braços abertos, porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos e número total de entradas nos braços abertos e fechados. As entradas e saídas foram definidas como a colocação das quatro patas do animal dentro ou fora do braço do aparato. As variáveis etológicas avaliadas foram: exploração vertical (movimento vertical no qual o animal

mantém seu corpo erguido somente pelas patas traseiras), imersão de cabeça (movimento exploratório de cabeça/ombros sobre a borda lateral dos braços abertos em direção ao chão) e autolimpeza (ato de limpar qualquer parte da superfície corporal com a língua, dentes e/ou patas dianteiras).

### **3.6.2. Campo aberto**

O teste de campo aberto também foi realizado nos animais com 3, 6 e 12 meses de idade. A aparato consiste em uma arena quadrada (60 X 60 cm), fechada lateralmente por 4 paredes de 45 cm de altura e demarcada no chão com 16 quadrantes com tamanhos iguais (15 X 15 cm). Dos 16 quadrantes, 12 ficavam em contato com as paredes da arena, sendo denominados de quadrantes laterais, enquanto 4 quadrantes não estavam em contato com as paredes do aparato, sendo então denominados de quadrantes centrais. Os animais foram colocados individualmente no centro da arena e os comportamentos foram gravados por 5 min e analisados posteriormente usando o software EthoWatcher®. Após percorrido os 5 minutos, o animal foi devolvido para sua caixa. A arena foi higienizada com álcool 20%, evitando assim pistas odoríferas para o próximo animal que foi submetido ao teste.

As variáveis analisadas no campo aberta foram: número de cruzamentos nos quadrantes; frequência de entradas nos quadrantes centrais da arena e índice de tigmotaxia, ou seja, a preferência do animal pelos cantos da arena, calculado através da porcentagem de tempo em que o animal permaneceu nos quadrantes laterais em razão do tempo total do teste. Além disso, foi quantificado a frequência de autolimpeza e de exploração vertical, quando o animal ficava apoiado somente nas patas traseiras e se elevava para explorar o ambiente.

### **3.6.3. Reconhecimento de objetos**

O teste de reconhecimento de objetos é utilizado para avaliar a retenção de memória (Botton *et al.*, 2010; Gaskin *et al.*, 2010;). Faz-se o uso de um índice de reconhecimento como uma medida direta da avaliação do tempo que o animal leva explorando um objeto desconhecido, em relação ao tempo total que o animal leva explorando o objeto desconhecido e o objeto ao qual já estava habituado. O princípio do teste de memória e reconhecimento de objetos é uma resposta dos comportamentos exploratórios de ratos, pois sabe-se que, quando um estímulo ao qual o animal já está

habituação e um novo estímulo são apresentados simultaneamente, o roedor explora mais o novo estímulo (Antunes e Biala, 2012).

O reconhecimento de objetos foi avaliado aos 3, 6 e 12 meses de vida. O teste consistiu em 3 sessões de ambientação, seguidas de mais 3 sessões do teste propriamente dito. Para a ambientação, os animais foram expostos a uma arena (de madeira, preta, 60x60cm), em sessões de 15 minutos cada e intervalo de 24h entre as sessões. Vinte e quatro horas após a última exposição de ambientação os animais foram expostos novamente à arena para a sessão de treino, onde foi posto um objeto (cumbuca de porcelana amarela com a abertura para cima) e permitiu-se a exploração do objeto por 15 min, sendo este considerado então o objeto conhecido. Após 3h do treino, os animais foram novamente expostos à arena (Teste 1) desta vez, além do objeto já conhecido, um outro objeto (objeto desconhecido 1- uma tampa de cano plástica branca com a abertura voltada para baixo) foi inserido, e permitiu-se a exploração de ambos os objetos por 5 min. Por fim, 24h após o treino, os animais foram expostos a arena para o teste 2, que consistiu da substituição do objeto desconhecido 1, por um novo objeto (objeto desconhecido 2- carrinho de metal azul com as rodas voltadas para baixo), permitindo-se então a exploração de ambos os objetos por 5 min.

Todas as etapas foram filmadas para análise posterior usando o software EthoWatcher®, avaliando-se, no treino, o tempo de exploração do objeto e nas sessões de teste 1 e teste 2 foi calculado o índice de reconhecimento do objeto desconhecido em relação ao tempo total de exploração de ambos os objetos. Entre as exposições dos animais, a arena e os objetos foram limpos com álcool 20%, a fim de se evitar possíveis pistas odoríferas.

### **3.7. Dosagem de corticosterona**

A dosagem plasmática de corticosterona foi mensurada através da técnica de radioimunoensaio (RIA), utilizando-se um anticorpo anti-corticosterona (#C8784, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os limites para detecção do radioimunoensaio foi de 7,8 a 2000 µg/dL. A técnica se baseia na reação antígeno-anticorpo, basicamente, segundo Yalow (1978), um hormônio radiomarcado se liga a um anticorpo específico formando o complexo radiomarcado antígeno-anticorpo que emite radioatividade. A técnica mensura a capacidade de um hormônio não-marcado, contido em uma amostra,

em competir com o hormônio marcado e impedir a ligação desse com o anticorpo. Como resultado da inibição competitiva, a relação hormônio radiomarcado complexado ao anticorpo/ hormônio radiomarcado livre diminui quando a concentração do hormônio não marcado aumenta. A concentração em uma amostra desconhecida é obtida comparando a inibição observada, através da mensuração da radioatividade produzida, com aquelas produzidas por soluções padrões, contendo quantidades conhecidas do hormônio.

### **3.8. Análise dos vídeos**

Os testes comportamentais foram gravados por meio do programa Virtual Dub e posteriormente analisados por meio do software Ethowatcher® (Crispim et al 2012). O software permite a criação manual de um catálogo comportamental com as variáveis de acordo com o teste utilizado. Terminada a análise, o programa criou um arquivo contendo latência, duração e frequência para cada uma das categorias comportamentais salvas previamente.

### **3.9. Eutanásia e extração de órgãos**

Aos 6 e 12 meses de vida, 24h após o teste de tolerância a insulina, os animais em jejum de 8-10h, foram anestesiados com cetamina (80mg/kg) e xilazina (12mg/kg i.p.) e então avaliados os reflexos palpebral, pupilar e interdigital para determinação do nível de anestesia. Com o animal em plano anestésico cirúrgico, foi realizada coleta de sangue intracárdica e a eutanásia se deu por decapitação usando guilhotina. Para a coleta de tecidos foi feita uma incisão longitudinal mediana na pele e musculatura, iniciada na região pré-pubiana indo na direção caudo-cranial até o manúbrio.

Os órgãos de interesse foram visualizados e identificados. Com o auxílio de uma pinça e uma tesoura, foram removidos na seguinte ordem: fígado, pâncreas e encéfalo. Depois da remoção, os órgãos foram identificados, pesados e armazenados para posterior análise.

### **3.10. Análise estatística**

As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas pelo teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Fischer's LSD. Para a análise estatística foram retirados os outliers de cada grupo e para isso a fórmula média  $\pm$  2 vezes o desvio padrão da média foi aplicada para cada conjunto de dados, e os valores acima do valor máximo dado pela fórmula ou os valores abaixo do valor mínimo dado pela fórmula foram desconsiderados para análise. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (Prisma Graph-Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA) nos gráficos e nas tabelas estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média. O nível de significância adotado foi de  $p < 0.05$ .

## 4. RESULTADOS

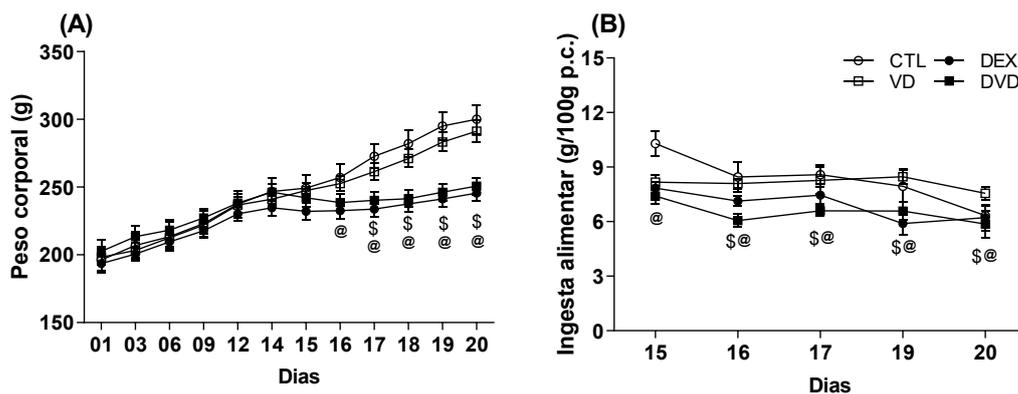
Os resultados serão apresentados em três seções, de acordo com os parâmetros avaliados, conforme segue:

- 1° Parâmetros desenvolvimentais;
- 2° Parâmetros metabólicos;
- 3° Parâmetros comportamentais.

### 4.1. Parâmetros desenvolvimentais

#### 4.1.1. Peso corporal durante a gestação e ingesta alimentar durante o tratamento com dexametasona.

O peso corporal inicial das gestantes foi similar entre os grupos e manteve-se assim até o 15° dia de gestação. A partir do 16° dia, o tratamento com dexametasona aboliu o ganho de peso, levando a um menor peso dos grupos que receberam DEX quando comparados aos grupos controles (20° dia, efeito da DEX:  $p < 0,0001$ ;  $F(1, 35) = 37,06$ ;  $r^2 = 51,06$ ; Figura 1A). Nesse aspecto, a administração com VD, *per se*, não exerceu nenhuma influência (Figura 1A). Com relação a ingesta alimentar, avaliada durante o tratamento com DEX nas gestantes, os resultados da ANOVA mostraram um efeito da DEX promovendo redução desse parâmetro do 15° ao 20° dia de gestação nos grupos DEX e DVD, sem efeito da administração com VD (20° dia, efeito da DEX:  $p = 0,0005$ ;  $F(1, 27) = 33,75$ ;  $r^2 = 51,06$ ; Figura 1B).



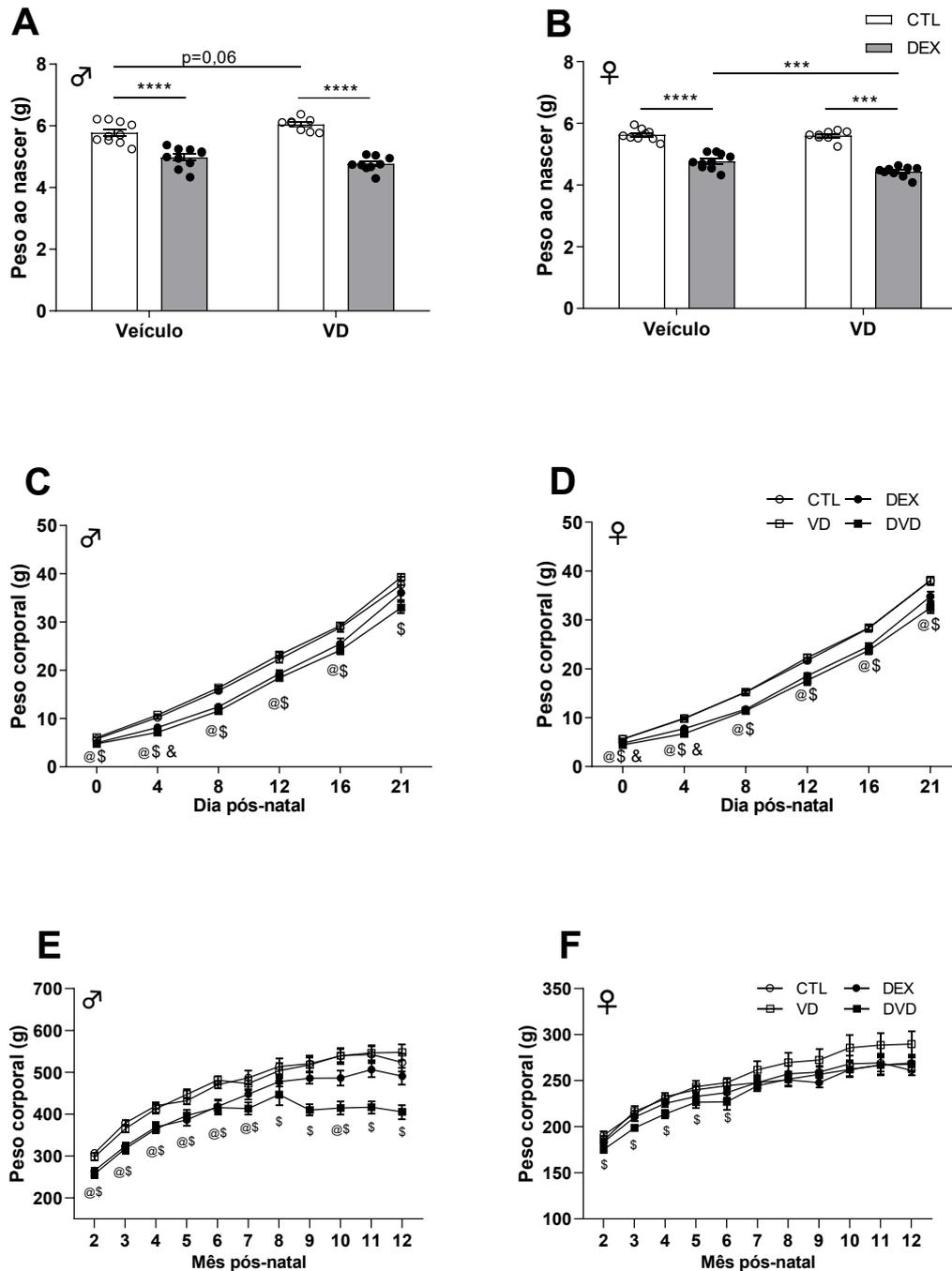
**Figura 1.** Peso corporal durante a gestação (A) e ingesta alimentar durante o tratamento com dexametasona (B). ANOVA de duas vias seguida dos pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM.  $p < 0,05$ ; @ diferença significativa entre os grupos CTL e DEX; \$ diferença significativa entre os grupos VD e DVD; & diferença significativa entre os grupos VD e DVD; & diferença entre os grupos DEX e DVD.

#### 4.1.2. Peso corporal no dia do nascimento, durante a lactação e na vida adulta

Houve redução no peso ao nascer de machos ( $p < 0.0001$ ;  $F_{1, 33} = 116.1$ ;  $r^2 = 76.55$ ; Figura 2A) e fêmeas ( $p < 0.0001$ ;  $F_{1, 32} = 230.8$ ;  $r^2 = 84.39$ ; Figura 2B) expostos à DEX no período pré-natal. Além disso, os resultados da ANOVA mostraram interação significativa entre os fatores DEX e VD em machos ( $p = 0.01$ ;  $F_{1, 33} = 6.16$ ;  $r^2 = 4.06$ ; Figura 2A). Com relação a essa interação, o pós-teste revelou uma tendência estatística entre os grupos CTL e VD ( $p = 0,06$ ) mas não entre os grupos DEX e DVD, confirmando a interação evidenciada pela ANOVA. Nas fêmeas, a interação significativa entre os fatores DEX e VD ( $p = 0.02$ ;  $F_{1, 32} = 5.45$ ;  $r^2 = 1.99$ ; Figura 2B) levou à exacerbação na redução de peso ao nascer como mostrado pelo pós-teste na diferença significativa entre os grupos DEX e DVD. A ANOVA mostrou um efeito da VD em fêmeas ( $p = 0.01$ ;  $F_{1, 32} = 7.45$ ;  $r^2 = 2.72$ ; Figura 2B), contudo, os resultados do pós-teste não confirmaram essa diferença, uma vez que os grupos CTL e VD são estatisticamente similares. Além disso, no final do período de lactação, no 21º dia pós-natal, somente machos ( $p = 0.06$ ;  $F_{1, 32} = 8.50$ ;  $r^2 = 19.66$ ; Figura 2C) e fêmeas ( $p < 0.0001$ ;  $F_{1, 32} = 21.78$ ;  $r^2 = 38.60$ ; Figura 2D) expostos à DEX no período pré-natal tiveram redução no peso corporal quando comparados aos seus respectivos grupos controles. Não houve influência da VD nesse parâmetro.

O peso corporal foi avaliado mensalmente até o final do período experimental (12 meses). Com relação a esse parâmetro, a exposição pré-natal à DEX promoveu redução do peso corporal em machos até 12 meses de idade (Figura 2E). Além disso, do 9º ao 12º

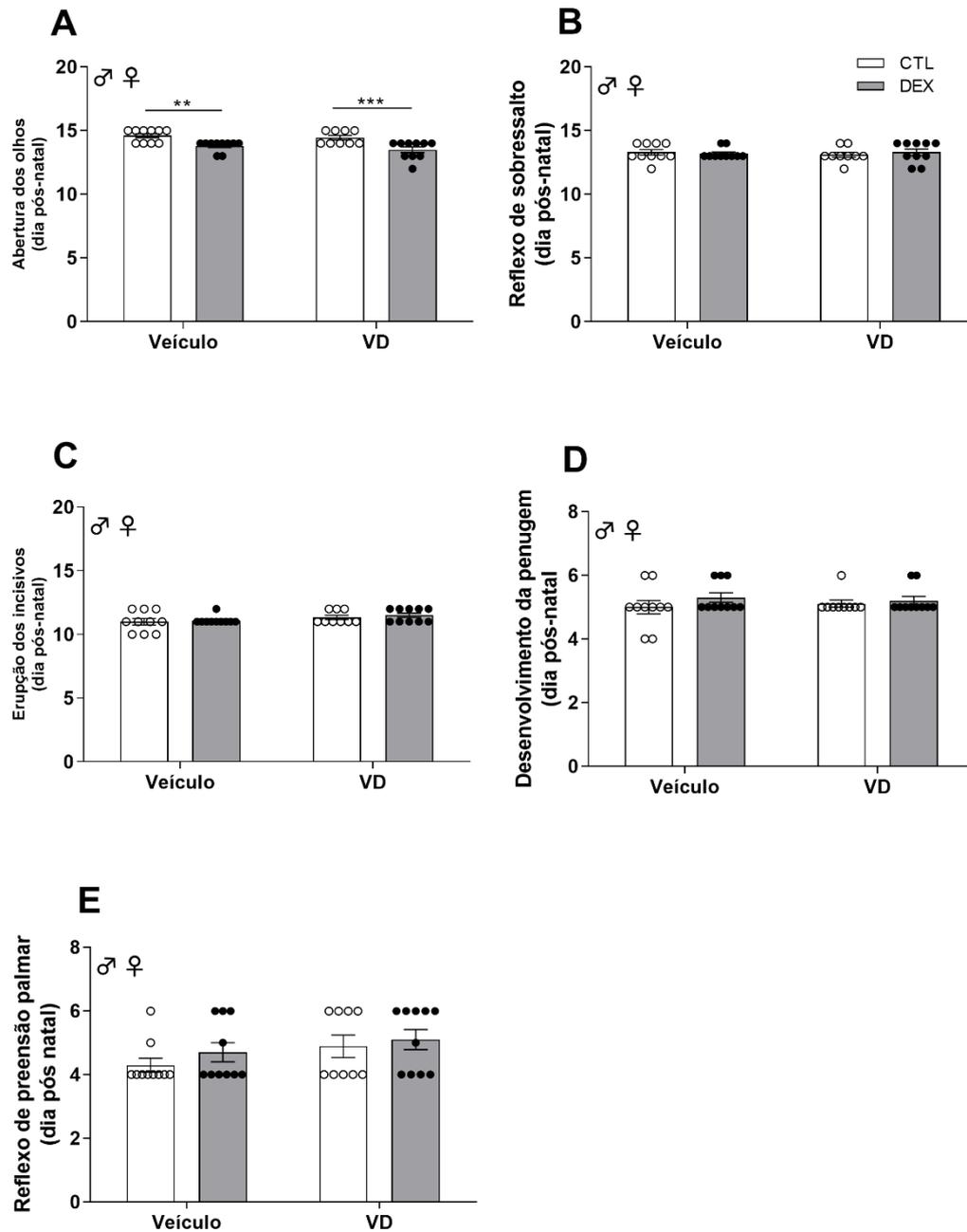
mês, os resultados da ANOVA mostraram uma interação significativa entre os fatores DEX e VD causando exacerbação na redução no peso corporal em machos do grupo DVD, como confirmado pelas comparações do pós-teste. Embora os resultados da ANOVA também tenham mostrado um efeito, *per se*, da VD no peso corporal de machos no 9º, 10º e 11º mês de idade, estas diferenças não foram evidenciadas pelo pós-teste, considerando que não houve diferença significativa entre os grupos CTL e VD (Figura 2E). O Tratamento pré-natal com DEX também causou redução no peso corporal de fêmeas, mas somente até o 6º mês de idade, a partir dessa idade todos os grupos foram estatisticamente similares até o final do período experimental (Figura 2F).



**Figura 2.** Peso ao nascer em machos (A) e fêmeas (B); peso corporal durante a lactação em machos (C) e fêmeas (D) e peso durante a idade adulta em machos (E) e fêmeas (F) nascidos de mães tratadas com DEX (barras cinzas) ou não (barras brancas) administrado com VD (VD) ou óleo (Veículo). ANOVA de duas vias seguida dos pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM.  $p < 0,05$ ; @ diferença significativa entre os grupos CTL e DEX; § diferença significativa entre os grupos VD e DVD; & diferença entre os grupos DEX e DVD; \*\*\*  $\leq 0,0009$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### 4.1.3. Desenvolvimento físico e de reflexos da prole

A figura 3 ilustra os resultados dos testes que avaliaram os parâmetros desenvolvimentais da prole, considerando a ninhada como unidade. O dia da abertura bilateral dos olhos foi adiantado nos animais que foram expostos à DEX no período pré-natal, sem influência da administração com VD ( $p < 0,0001$ ;  $F_{1, 35} = 24,16$ ;  $r^2 = 39,44$ ; Figura 3A). Em relação ao dia de aparecimento do reflexo de sobressalto e erupção dos dentes incisivos, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos estudados (Figs. 3 B e C, respectivamente,  $p > 0,05$ ), bem como não houve diferença significativa entre os grupos experimentais no dia de aparecimento da penugem (Figura 3D,  $p > 0,05$ ) e do reflexo de sobressalto (Figura 3E,  $p > 0,05$ ).

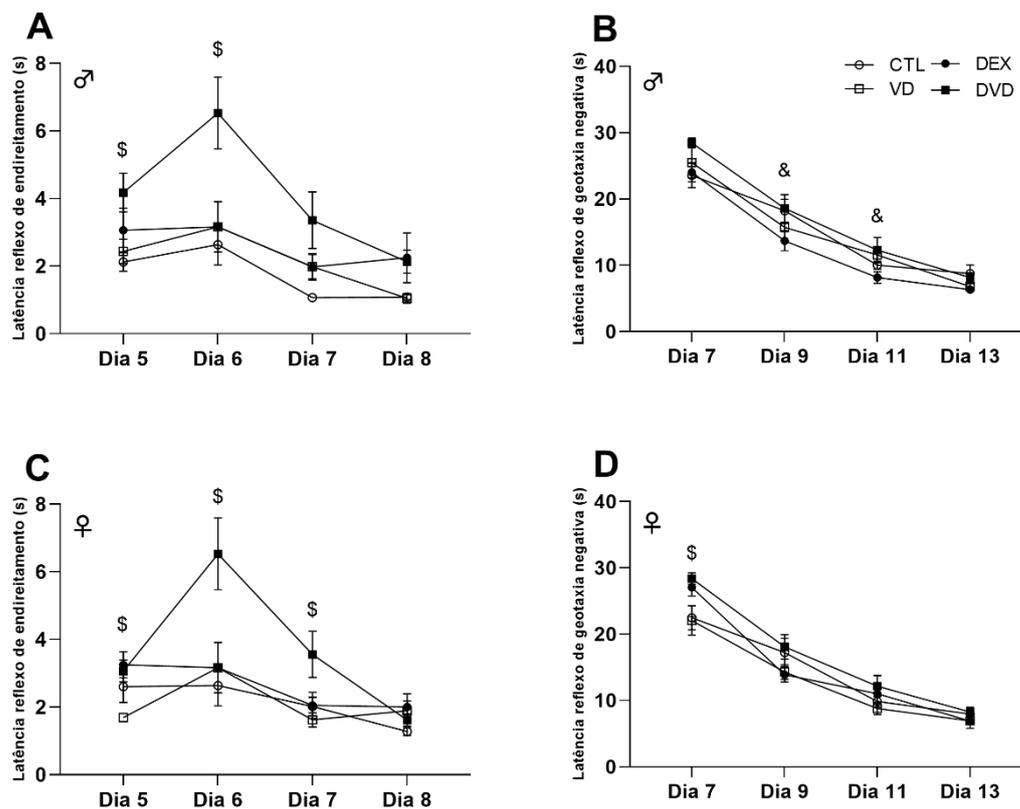


**Figura 3** Parâmetros desenvolvimentais avaliados pelo dia de abertura bilateral dos olhos (A), dia de aparecimento do reflexo de sobressalto (B), dia de erupção dos dentes incisivos (C), dia de aparecimento da penugem (D) e dia de aparecimento do reflexo de preensão palmar (E) em animais nascidos de mães tratadas com DEX (barras cinzas) ou não (barras brancas) administrado com VD (VD) ou óleo (Veículo). ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM.  $P < 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,009$ ; \*\*\*  $\leq 0,0009$ ;

Os resultados da ANOVA mostraram que o tratamento pré-natal com DEX promoveu aumento na latência para execução do reflexo de endireitamento em machos em todos os dias em que este foi avaliado, contudo, os resultados do pós-teste evidenciaram diferença significativa entre os grupos VD e DVD somente nos dias 5 e 6

pós-natal (Figura 4A,  $p=0,01$  e  $0,004$ , respectivamente), além disso houve efeito significativo da administração gestacional com VD no 7º dia pós-natal ( $p=0,02$ ;  $F_{1, 32}= 5,32$ ;  $r^2=12,44$ ), porém esta diferença não foi confirmada pelo resultado do pós-teste, uma vez que os grupos CTL e VD foram estatisticamente similares. Assim como em machos, o tratamento pré-natal com DEX promoveu aumento na latência para execução do reflexo de endireitamento em fêmeas no 5º, 6º e 7º dia pós-natal (Figura 4C,  $p<0,05$ ). Ainda, no 6º dia pós-natal, os resultados da ANOVA mostraram um efeito significativo da administração gestacional com VD ( $p=0,02$ ;  $F_{1, 35}= 5,55$ ;  $r^2=11,62$ ) contudo, os resultados do pós-teste não mostraram diferença entre os grupos CTL e VD, assim como não confirmaram a interação dos fatores DEX e VD evidenciada pela ANOVA no 7º dia pós natal ( $p=0,04$ ;  $F_{1, 33}= 4,40$ ;  $r^2=10,01$ ).

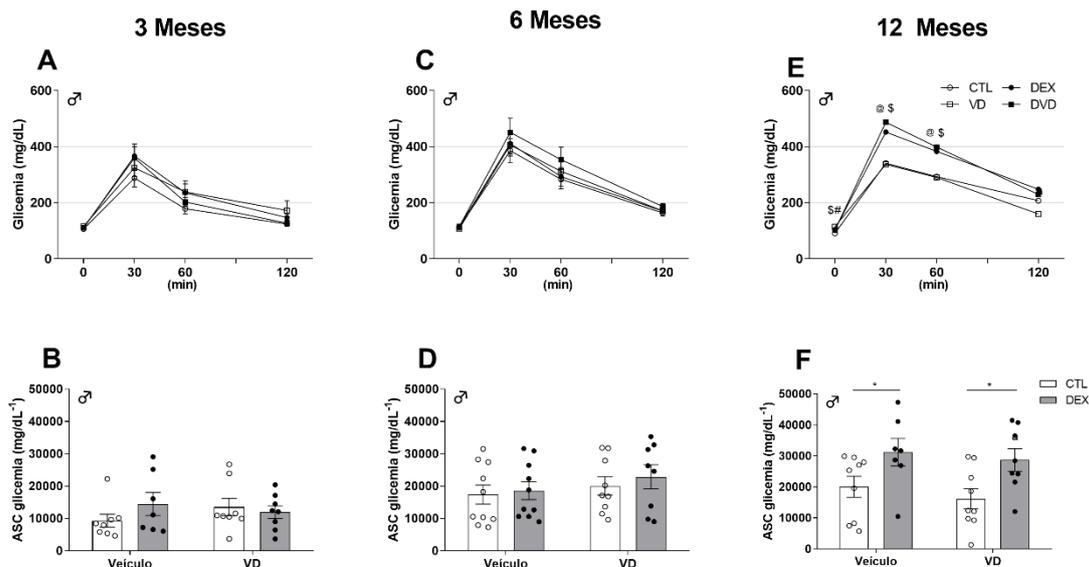
Já com relação ao reflexo de geotaxia negativa em machos, houve uma interação significativa entre os fatores DEX e VD no 9º e 13º dia pós-natal (9º dia:  $p=0,01$ ;  $F_{1, 32}= 6,11$ ;  $r^2=15,68$ ; 11º dia: (9º dia:  $p=0,01$ ;  $F_{1, 32}= 7,04$ ;  $r^2=17,71$  Figura 4B), e o pós-teste confirmou que o tratamento pré-natal com DEX diminuiu o tempo para execução deste reflexo enquanto a administração gestacional com VD preveniu a redução deste parâmetro. Ainda com relação ao reflexo de geotaxia negativa em machos, no 11º dia pós-natal os resultados da ANOVA mostraram um efeito da administração com VD ( $p=0,03$ ;  $F_{1, 33}= 4,96$ ;  $r^2=12,67$ ), porém, os resultados do pós-teste somente mostraram diferença significativa entre os grupos DEX e DVD ( $p=0,02$ ). Com relação a este parâmetro avaliado também em fêmeas (Figura 4D), os resultados da ANOVA mostraram efeito do tratamento pré-natal com DEX somente no 7º dia pós-natal, levando a um aumento na latência para execução do reflexo de geotaxia negativa nos animais expostos a DEX pré-natal ( $p=0,0006$ ;  $F_{1, 32}= 14,36$ ;  $r^2=30,94$ ). Ainda, no 9º dia pós-natal houve uma interação entre os fatores DEX e VD ( $p=0,04$ ;  $F_{1, 32}= 4,21$ ;  $r^2=11,58$ ).



## 4.2. Parâmetros metabólicos

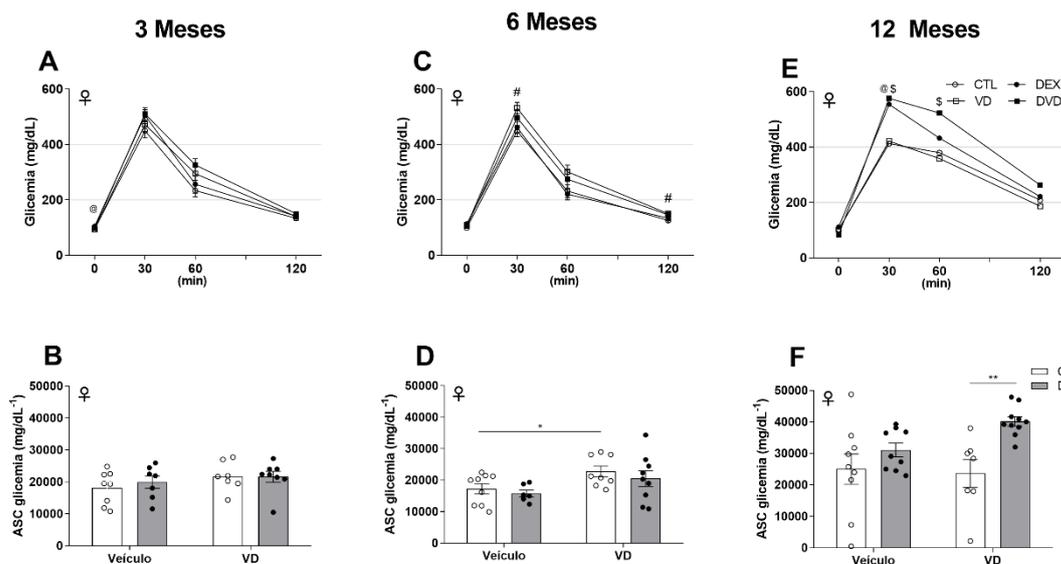
### 4.2.1. Teste de tolerância intraperitoneal a glicose na prole adulta

O teste de tolerância intraperitoneal à glicose foi realizado em machos (Figura 5) e fêmeas (Figura 6) aos 3, 6 e 12 meses pós-natal. Os resultados da ANOVA em machos mostraram que os grupos foram estatisticamente similares aos 3 (Figuras 5A e B) e 6 meses (Figura 5C e D). Contudo, aos 12 meses, os machos que foram expostos ao tratamento com DEX no período pré-natal apresentaram valores elevados de glicemia aos 30, 60 e 120 minutos após o desafio glicêmico, bem como elevados valores da área sob a curva quando comparados aos grupos CTL e VD ( $p=0.002$ ;  $F_{1, 29}= 10.54$ ;  $r^2=27.17$ , Figuras. 5E e F). Nesse contexto, não houve efeito significativo da administração gestacional com VD em nenhuma das idades em que os animais foram avaliados.



**Figura 5.** Valores da glicemia durante o teste de tolerância intraperitoneal a glicose (A, C e E) e valores da área sob a curva obtida durante o OGTT (B, D e F) em machos nascidos de mães tratadas com DEX (barras cinzas) ou não (barras brancas) administrado com VD (VD) ou óleo (Veículo). ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM.  $P < 0,05$ ; \* $p < 0,05$ ; @diferença significativa entre os grupos CTL e DEX; \$diferença significativa entre os grupos VD e DVD; #diferença entre os grupos CTL e VD.

Os resultados do desafio glicêmico nas fêmeas foram estatisticamente similares entre os grupos aos 3 meses (Figura 6A e B). Contudo, aos 6 meses, fêmeas que nasceram de mães que foram administradas com VD durante a gestação apresentaram elevados valores de glicemia aos 30, 60 e 120 minutos após a administração de glicose e maiores valores da área sob a curva ( $p=0.01$ ;  $F_{1, 28} = 6.74$ ;  $r^2=19.08$ , Figuras. 6C e D) quando comparados ao grupo CTL. Entretanto, esses resultados foram transientes, uma vez que a intolerância à glicose induzida pela administração gestacional com VD desapareceu nos animais avaliados aos 12 meses pós-natal (Figura 6E e F). Contudo, nessa mesma idade, a prole de fêmeas expostas à administração de DEX no período gestacional apresentaram valores elevados de glicemia aos 30 e 60 minutos após o desafio glicêmico e maiores valores da área sob a curva ( $p=0.002$ ;  $F_{1, 31} = 11.12$ ;  $r^2=23.87$ , Figura. 6E e F) quando comparados ao grupo CTL.

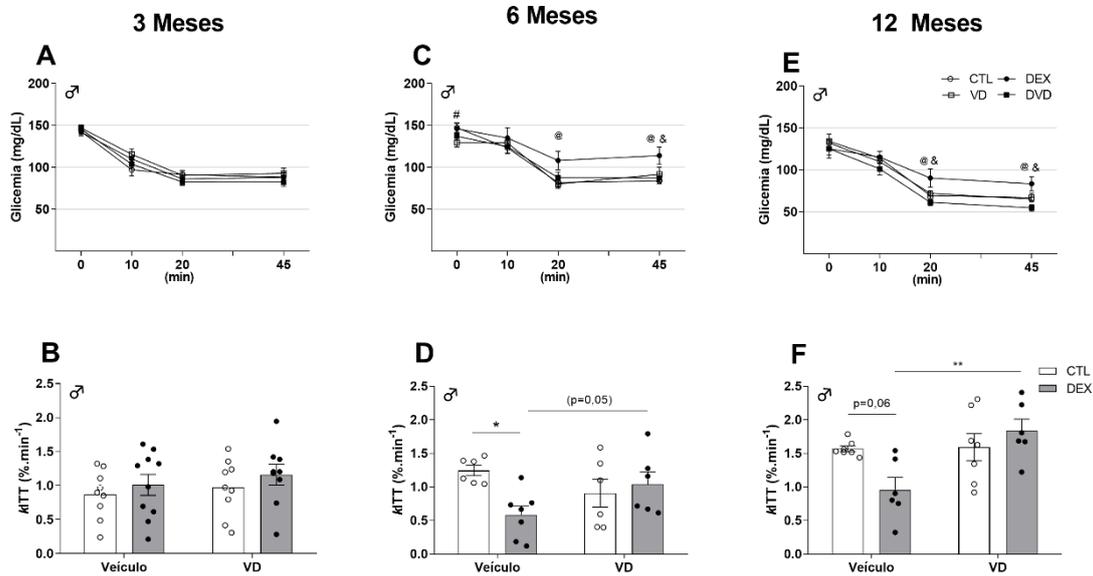


**Figura 6.** Valores da glicemia durante o teste de tolerância intraperitoneal a glicose (A, C e E) e valores da área sob a curva obtida durante o OGTT (B, D e F) em fêmeas nascidas de mães tratadas com DEX (barras cinzas) ou não (barras brancas) administrado com VD (VD) ou óleo (Veículo). ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,009$ ; @diferença significativa entre os grupos CTL e DEX; §diferença significativa entre os grupos VD e DVD; #diferença entre os grupos CTL e VD.

#### 4.2.2. Teste de tolerância intraperitoneal a insulina na prole adulta

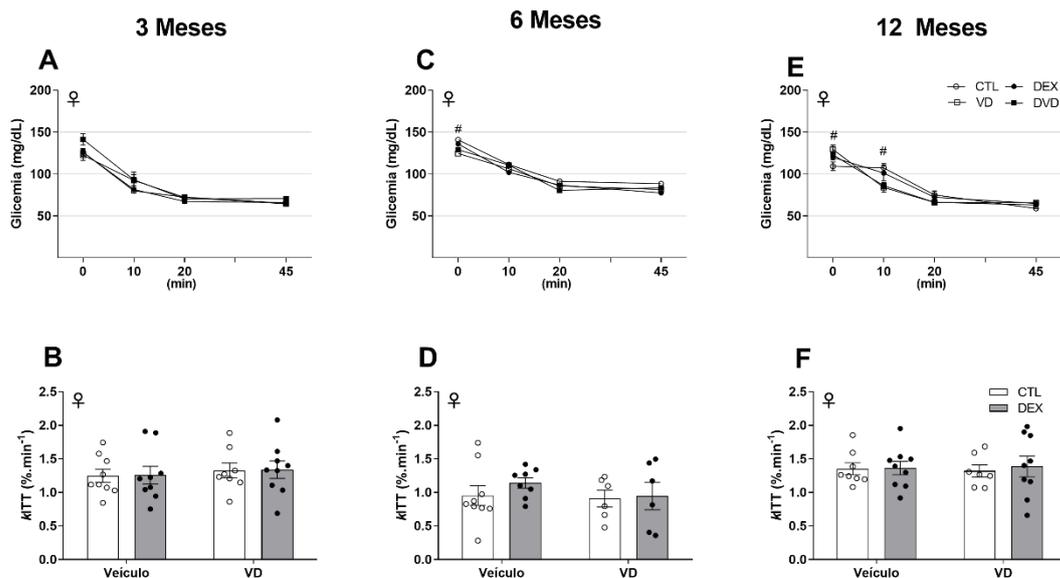
A constante de decaimento ( $k_{ITT}$ ), calculada usando os valores de glicemia durante o teste de tolerância intraperitoneal à insulina foi avaliada em machos (Figura 7) e fêmeas (Figura 8) aos 3, 6 e 12 meses de idade. Em resposta à administração de insulina exógena, não houve diferença significativa nos valores de glicemia durante o ITT nem nos valores da  $k_{ITT}$  em machos aos 3 meses pós-natal (Figura 7 A e B). Contudo, aos 6 meses de idade, os resultados mostraram que houve uma redução nos valores da  $k_{ITT}$  em machos que foram expostos à DEX pré-natal quando comparados ao grupo CTL ( $p = 0,03$ , Fig. 7D). Além disso, os resultados da ANOVA mostraram uma interação significativa entre os fatores DEX e VD ( $p = 0,02$ ;  $F_{1, 22} = 6,25$ ;  $r^2 = 20,44$ ), indicando que a administração gestacional de VD preveniu o prejuízo glicêmico induzido pela administração pré-natal com DEX (Figura 7C e D). Resultados similares foram observados em machos com 12 meses de idade. Mesmo que o pós-teste tenha mostrado uma diferença marginal entre CTL e DEX ( $p = 0,06$ ) os resultados da ANOVA mostraram interação significativa entre DEX e VD ( $p = 0,01$ ;  $F_{1, 21} = 7$ ;  $r^2 = 18,93$ ) levando à um aumento de  $k_{ITT}$  no grupo DVD quando comparado ao grupo DVD, como evidenciado pelos resultados do pós-teste ( $p = 0,006$ , Figuras 7E e F). Ainda, em machos com 12 meses

de idade, embora tenha havido um efeito significativo da VD ( $p=0.01$ ;  $F_{1, 22}= 7.73$ ;  $r^2=20.92$ ) o resultado do pós-teste não confirmou essa diferença, uma vez que os grupos CTL e VD foram estatisticamente similares.



**Figura 7.** Valores da glicemia durante o teste de tolerância intraperitoneal a insulina (A, C e E) e valores da KITT durante o iITT (B, D e F) em machos nascidos de mães tratadas com DEX (barras cinzas) ou não (barras brancas) administrado com VD (VD) ou óleo (Veículo). ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM.  $P<0,05$ ; \*  $p<0,05$ ; \*\* $p\leq 0,009$ ; @diferença significativa entre os grupos CTL e DEX; &diferença significativa entre os grupos DEX e DVD; #diferença entre os grupos CTL e VD.

Com relação aos resultados de responsividade à administração intraperitoneal de insulina em fêmeas, não houve diferença significativa aos 3 (Figura 8<sup>a</sup> e B), 6 (Figura 8C e D) ou 12 (Figura 8E e F) meses pós-natal.



**Figura 8.** Valores da glicemia durante o teste de tolerância intraperitoneal a insulina (B, D e F) e valores da kITT durante o iITT (B, D e F) em fêmeas nascidas de mães tratadas com DEX (barras cinzas) ou não (barras brancas) administrado com VD (VD) ou óleo (Veículo). ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM.  $P < 0,05$ ; #diferença entre os grupos CTL e VD.

#### 4.2.3. Massa de tecido adiposo branco na prole adulta

A administração pré-natal de DEX causou uma redução significativa no peso relativo do tecido adiposo omental ( $p=0,007$ ;  $F_{1, 30} = 8,090$ ;  $r^2=20,84$ ; Tabela 1) e perigonadal ( $p=0,04$ ;  $F_{1, 33} = 4,51$ ;  $r^2=11,39$ ; Tabela 1) em machos aos 6 meses de idade, enquanto que a administração gestacional com VD, *per se*, não exerceu nenhum efeito sobre esse parâmetro. Contudo, o peso relativo do tecido adiposo perirrenal e peso total das gorduras foram similares entre os grupos estudado (Tabela 1). No 12<sup>o</sup> mês pós-natal, não houve diferença significativa entre os grupos estudados com relação ao peso relativo do tecido adiposo omental e perigonadal, contudo, houve uma interação significativa entre DEX e VD causando redução no peso do tecido adiposo perirrenal ( $p=0,02$ ;  $F_{1, 29} = 5,43$ ;  $r^2=12,54$ ; Tabela 2) bem como no peso total das gorduras ( $p=0,03$ ;  $F_{1, 29} = 4,71$ ;  $r^2=8,97$ ; Tabela 2) somente em machos nascidos de mães que foram tratadas com VD e DEX concomitantemente.

**Tabela 1** Peso (g/100g p.c.) do tecido adiposo omental, perigonadal, perirrenal, peso total das gorduras e concentração de triglicerídeos e colesterol plasmáticos em machos e fêmeas com 6 meses de idade, nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrados com VD ou óleo. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SD.  $P < 0,05$ ; @diferença entre os grupos CTL e DEX; \$diferença entre os grupos VD e DVD.

<b>6 Meses</b>	<b>CTL ♂</b>	<b>DEX ♂</b>	<b>VD ♂</b>	<b>DVD ♂</b>	<b>Valor de p</b>
<i>T.A. Omental</i>	0.17 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.02 @	0.15 $\pm$ 0.04	0.13 $\pm$ 0.04	p=0.007
<i>T.A. Perigonadal</i>	1.30 $\pm$ 0.31	1.13 $\pm$ 0.43 @	1.54 $\pm$ 0.38	1.20 $\pm$ 0.29 \$	p=0.0006
<i>T.A. Perirrenal</i>	1.86 $\pm$ 0.52	1.72 $\pm$ 0,78	1.76 $\pm$ 0.51	1.52 $\pm$ 0.57	NS
<i>T.A. Total</i>	3.34 $\pm$ 0.85	3.01 $\pm$ 1.21	3.65 $\pm$ 1.06	3.20 $\pm$ 1.27	NS
<i>TAG plasmático</i>	68.1 $\pm$ 31.7	53.3 $\pm$ 18.4	59.4 $\pm$ 20.8	51.2 $\pm$ 20.6	NS
<i>CT plasmático</i>	70.5 $\pm$ 14.2	79.2 $\pm$ 24.1	77.9 $\pm$ 16.1	87.1 $\pm$ 19.2	NS

	<b>CTL ♀</b>	<b>DEX ♀</b>	<b>VD ♀</b>	<b>DVD ♀</b>	<b>Valor de p</b>
<i>T.A. Omental</i>	0.17 $\pm$ 0.03	0.16 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.06	NS
<i>T.A. Perigonadal</i>	1.42 $\pm$ 0.56	1.11 $\pm$ 0.38	1.55 $\pm$ 0.44	1.10 $\pm$ 0.41	NS
<i>T.A. Perirrenal</i>	1.87 $\pm$ 0.30	1.80 $\pm$ 0.76	2.09 $\pm$ 0.45	1.99 $\pm$ 0.95	NS
<i>T.A. Total</i>	3.40 $\pm$ 0.71	3.46 $\pm$ 1.54	3.84 $\pm$ 0.87	3.04 $\pm$ 1.13	NS
<i>TAG plasmático</i>	44.5 $\pm$ 8.2	45.2 $\pm$ 6	54.2 $\pm$ 6.2	46.9 $\pm$ 12.7	NS
<i>CT plasmático</i>	78 $\pm$ 15.1	70.2 $\pm$ 16.6	82.7 $\pm$ 15.5	68.7 $\pm$ 18.4	NS

Com relação ao peso das gorduras em fêmeas, embora os resultados da ANOVA tenham mostrado um efeito da DEX no tecido adiposo perigonadal aos 6 meses ( $p=0.02$ ;  $F_{1, 31} = 5.87$ ;  $r^2=15.86$ ; Tabela 1), o pós-teste não confirmou essa diferença, uma vez que os grupos CTL e DEX foram estatisticamente semelhantes. Nessa mesma idade, não houve diferença significativa no peso relativo do tecido adiposo omental, perirrenal e peso total das gorduras entre os grupos estudados. (Tabela 1). Resultados similares foram observados em fêmeas no 12º mês pós-natal, onde o peso relativo do tecido adiposo omental, perigonadal, perirrenal e peso total das gorduras foram estatisticamente semelhantes entres os grupos experimentais (Tabela 2).

**Tabela 2.** Peso (g/100g p.c.) do tecido adiposo omental, perigonadal, perirrenal, peso total das gorduras e concentração de triglicerídeos e colesterol plasmáticos em machos e fêmeas com 12 meses de idade, nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrados com VD ou óleo. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SD.  $P < 0,05$ ; #diferença entre os grupos CTL e VD; \$diferença entre os grupos VD e DVD; &diferença entre os grupos DEX e DVD.

12 Meses	CTL ♂	DEX ♂	VD ♂	DVD ♂	Valor de p
<i>T.A. Omental</i>	0.28 $\pm$ 0.09	0.26 $\pm$ 0.13	0.27 $\pm$ 0.08	0.17 $\pm$ 0.09	NS
<i>T.A. Perigonadal</i>	1.44 $\pm$ 0.52	1.25 $\pm$ 0.40	1.64 $\pm$ 0.64	1.41 $\pm$ 0.44	NS
<i>T.A. Perirrenal</i>	2.50 $\pm$ 0.55	2.49 $\pm$ 1.21	2.60 $\pm$ 0.49	1.41 $\pm$ 0.4 <sup>\$&amp;</sup>	p<0,009
<i>T.A. Total</i>	5.16 $\pm$ 0.68	4.59 $\pm$ 1.88	5.10 $\pm$ 0.60	2.66 $\pm$ 1.2 <sup>\$&amp;</sup>	p<0,009
<i>TAG plasmático</i>	89 $\pm$ 19.9	100.1 $\pm$ 54.5	82 $\pm$ 26.4	95.3 $\pm$ 53.7	NS
<i>CT plasmático</i>	93.6 $\pm$ 20.5	90.1 $\pm$ 15.6	91 $\pm$ 19.9	121.5 $\pm$ 37.1	NS

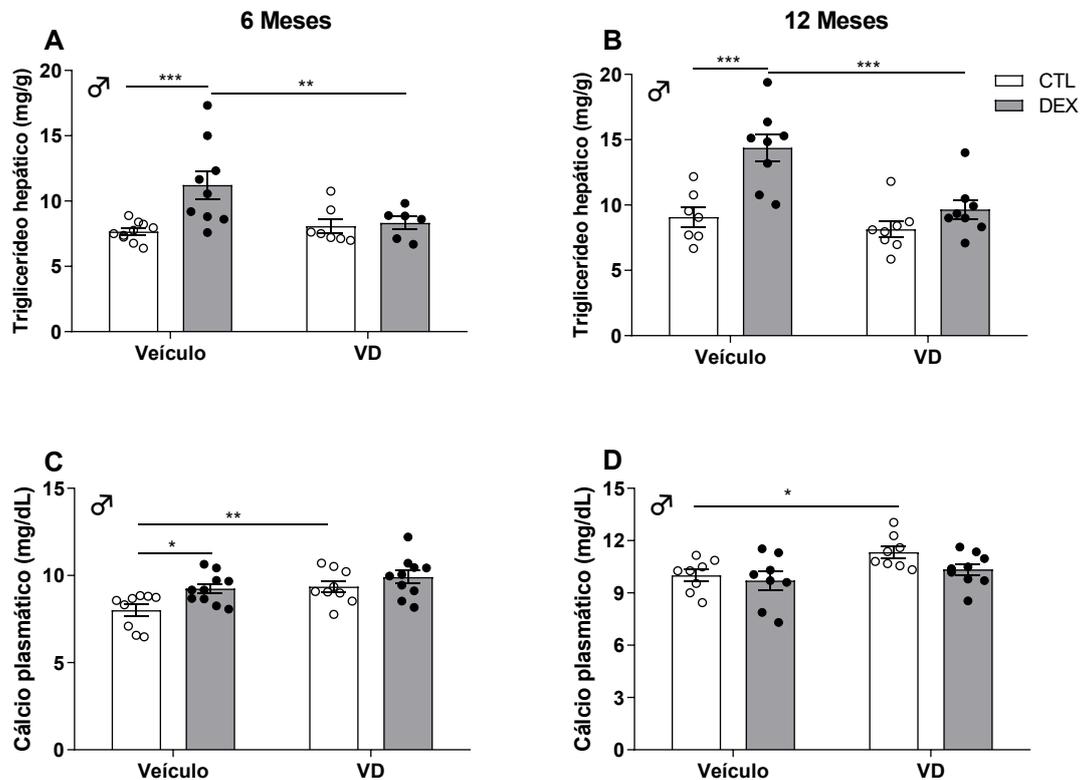
  

	CTL ♀	DEX ♀	VD ♀	DVD ♀	Valor de p
<i>T.A. Omental</i>	0.22 $\pm$ 0.09	0.24 $\pm$ 0.11	0.26 $\pm$ 0.06	0.30 $\pm$ 0.08	NS
<i>T.A. Perigonadal</i>	1.46 $\pm$ 0.07	1.44 $\pm$ 0.52	1.25 $\pm$ 0.40	1.64 $\pm$ 0.65	NS
<i>T.A. Perirrenal</i>	2.72 $\pm$ 1.56	2.64 $\pm$ 0.82	2.79 $\pm$ 0.87	2.63 $\pm$ 0.95	NS
<i>T.A. Total</i>	3.96 $\pm$ 2.71	4.33 $\pm$ 1.40	4.31 $\pm$ 0.86	4.58 $\pm$ 1.43	NS
<i>TAG plasmático</i>	67.3 $\pm$ 26.3	84 $\pm$ 36.4	43.4 $\pm$ 8.1 <sup>#</sup>	45.2 $\pm$ 11.9 <sup>&amp;</sup>	p<0,05
<i>CT plasmático</i>	78.7 $\pm$ 26.9	85.7 $\pm$ 14.5	78.1 $\pm$ 24.9	94.1 $\pm$ 16.4	NS

#### 4.2.4. Parâmetros bioquímicos

A administração pré-natal de DEX causou aumento no acúmulo de triglicerídeo hepático em machos aos 6 (p=0.01; F1, 28= 7.33; r2=15.79; Figura 9A) e 12 (p=0.0003; F1, 27= 17.69; r2=27.91; Figura 9B) meses quando comparados aos grupo CTL. Contudo, a interação significativa entre DEX e VD mostrou que a administração gestacional com VD foi capaz de atenuar o acúmulo de triglicerídeo hepático tanto aos 6 (p=0.02; F1, 28= 5.49; r2=11.82; Figura 9A) quanto aos 12 (p=0.02; F1, 27= 5.48; r2=8.66; Figura 9B) meses. Embora os resultados da ANOVA tenham mostrado um efeito da VD (p=0.001; F1, 27= 12.25; r2=19.32; Figura 9B), o pós-teste não evidenciou diferença estatística entre os grupos CTL e VD no que diz respeito a esse parâmetro. Com relação aos dados de triglicerídeo hepático em fêmeas, a ANOVA mostrou um efeito da DEX aos 6 meses (p=0.02; F1, 29= 5.61; r2=15.97; Figura 10A), contudo os resultados do pós-teste não mostraram nenhuma diferença estatística entre os grupos estudados. Além disso, esse

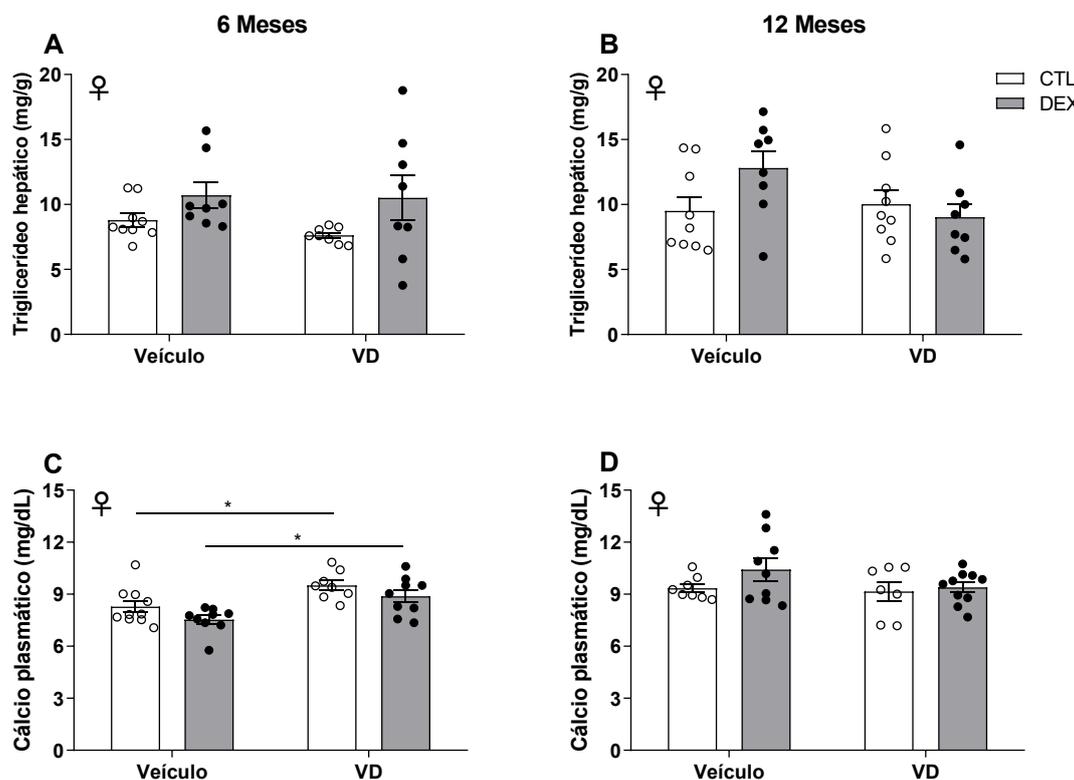
efeito desapareceu nas fêmeas com 12 meses (Figura 10B). Ao contrário do que foi visto em machos, a administração gestacional com VD não exerceu nenhum efeito significativo no conteúdo de triglicerídeo hepático em fêmeas tanto aos 6 (Figura 10A) quanto aos 12 (Figura 10B) meses de idade.



**Figura 9.** Conteúdo de triglicerídeo hepático em machos com 6 (A) e 12 (B) meses e concentração plasmática de cálcio em machos com 6 (C) e 12 (D) meses nascidos de mães tratadas com DEX (barras cinzas) ou não (barras brancas) administradas com VD (VD) ou óleo (Veículo). ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM.  $P < 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,009$ ; \*\*\*  $p \leq 0,0009$ .

A concentração plasmática de triglicerídeo foi estatisticamente similar entre os grupos de machos aos 6 (Tabela 1) e 12 (Tabela 2) meses de idade. Ao contrário do que foi visto em machos, fêmeas que nasceram de mães que receberam administração com VD, independente da administração pré-natal de DEX, apresentaram menores concentrações de triglicerídeo plasmático comparadas aos grupos CTL e DEX ( $p = 0.0008$ ;  $F_{1, 30} = 13.94$ ;  $r^2 = 30.25$ ; Tabela 2) aos 12 meses de idade. A concentração plasmática de colesterol total em machos e fêmeas não foi afetada nem pela administração com VD ou pela administração de DEX durante a gestação, independentemente da idade em que o parâmetro foi avaliado. (Tabelas 1 e 2)

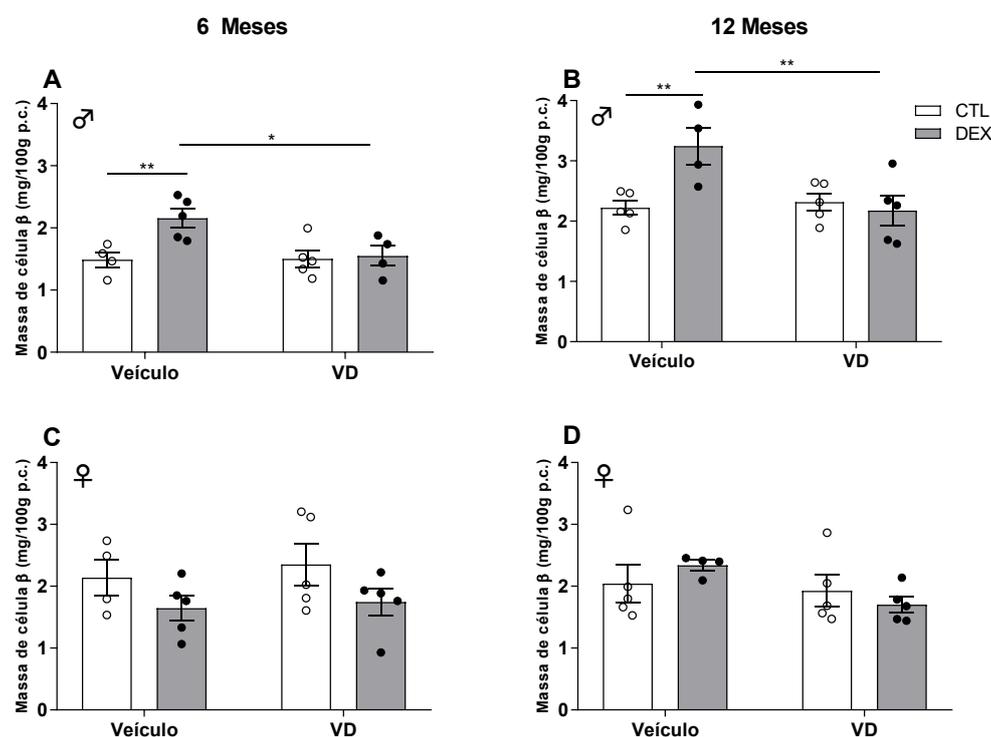
Tanto a administração gestacional com VD como a administração de DEX no período pré-natal, independentemente, levaram à um aumento nas concentrações plasmáticas de cálcio em machos aos 6 meses de idade ( $p=0.004$ ;  $F_{1, 34}= 9.42$ ;  $r^2=18.23$  e  $p=0.009$ ;  $F_{1, 34}= 7.46$ ;  $r^2=14.45$ , respectivamente; Figura 9C). Efeitos similares foram observados em fêmeas aos 6 meses (VD:  $p=0.0003$ ;  $F_{1, 32}= 16.55$ ;  $r^2=31.56$  e DEX:  $p=0.03$ ;  $F_{1, 32}= 4.69$ ;  $r^2=8.94$ , Figura 10C). Contudo, os resultados do pós-teste não mostraram diferença significativa entre os grupos CTL e DEX. Quando os animais foram avaliados aos 12 meses, somente machos que nasceram de mães que receberam VD apresentaram maiores concentrações plasmáticas de cálcio quando comparados ao grupo CTL ( $p=0.01$ ;  $F_{1, 29}= 6.54$ ;  $r^2=16.79$ , Figura 9D), independentemente do tratamento pré-natal com DEX. Além disso, nenhuma diferença significativa foi observada a respeito das concentrações plasmáticas de cálcio em fêmeas avaliadas aos 12 meses (Figura 10D).



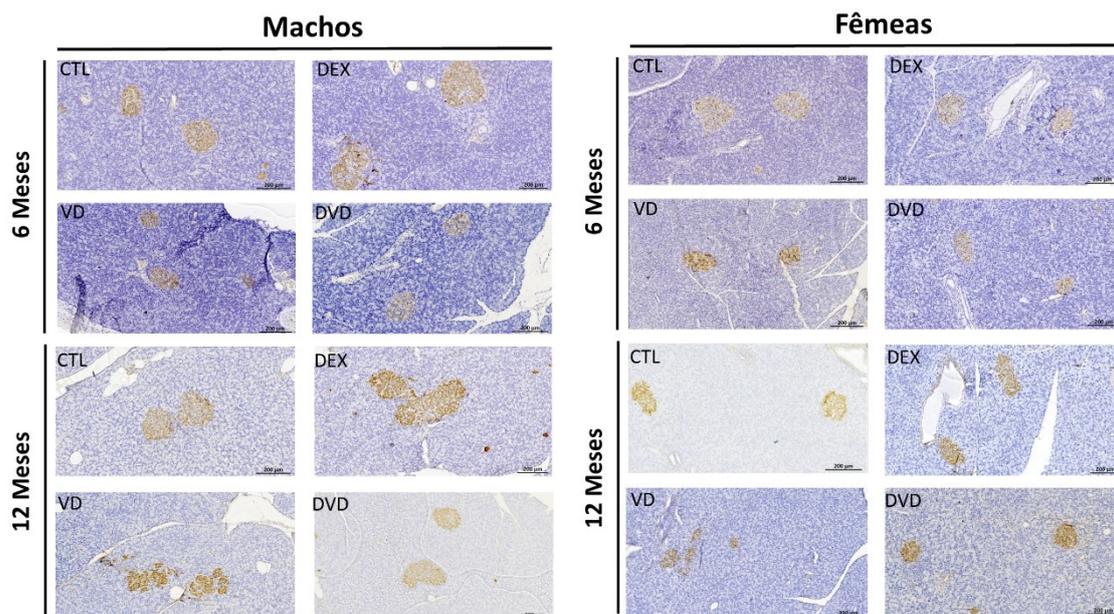
**Figura 10.** Conteúdo de triglicerídeo hepático em fêmeas com 6 (A) e 12 (B) meses e concentração plasmática de cálcio em fêmeas com 6 (C) e 12 (D) meses nascidas de mães tratadas com DEX (barras cinzas) ou não (barras brancas) administradas com VD (VD) ou óleo (Veículo). ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM.  $P < 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ .

#### 4.2.5. Massa de células beta

A administração pré-natal de DEX promoveu um aumento significativo na massa de células beta em machos aos 6 ( $p=0.02$ ;  $F_{1, 14}= 6.15$ ;  $r^2=20.34$ ; Figura 11A) e aos 12 meses ( $p=0.04$ ;  $F_{1, 15}= 4.59$ ;  $r^2=14.65$ ; Figura 11B). Contudo, houve uma interação significativa entre os fatores DEX e VD aos 6 ( $p=0.04$ ;  $F_{1, 14}= 4.61$ ;  $r^2=15.26$ ) e 12 meses ( $p=0.01$ ;  $F_{1, 15}= 8.03$ ;  $r^2=25.61$ ), indicando que a administração gestacional com VD suprimiu o aumento na massa de células beta induzido pela administração pré-natal de DEX. Ainda, em machos aos 6 meses, a administração gestacional com VD *per se*, não promoveu nenhuma alteração deste parâmetro. Embora a ANOVA tenha mostrado um efeito significativo da VD em machos com 12 meses ( $p=0.03$ ;  $F_{1, 15}= 5.61$ ;  $r^2=17.90$ ), o pós-teste não confirmou essa diferença, uma vez que os grupos CTL e VD foram estatisticamente similares. Os resultados da massa de célula beta em fêmeas aos 6 (Figura 11C) e 12 meses (Figura 11D) foram estatisticamente similares entre os grupos estudados.



**Figura 11.** Massa de célula beta em machos com 6 (A) e 12 (B) meses e fêmeas com 6 (C) e 12 (D) meses nascidas de mães tratadas com DEX (barras cinzas) ou não (barras brancas) administrado com VD (VD) ou óleo (Veículo). ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM.  $P < 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,009$ .



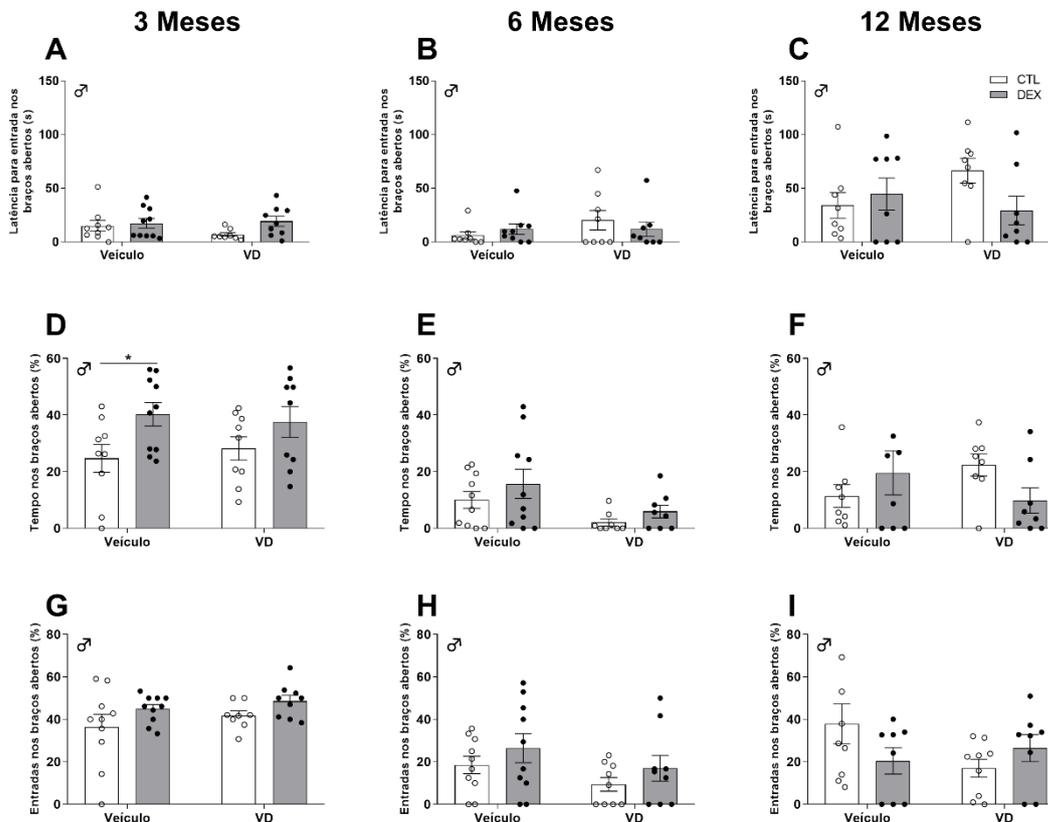
**Figura 12.** Imagens representativas de seções de pâncreas com magnitude final de 200X, de machos e fêmeas, aos 6 e 12 meses de idade, nascidos de mães tratadas somente com DEX (DEX) ou não (CTL), tratadas com DEX e administradas com VD (DVD) ou apenas administradas com VD (VD). As seções contendo tecido pancreático foram imunocoradas para insulina e contracoradas com hematoxilina. .

### 4.3. Parâmetros comportamentais

#### 4.3.1. Teste de labirinto em cruz elevado

A latência para entrada nos braços abertos do labirinto em machos com 3, 6 e 12 meses (Figura 12 A, B e C, respectivamente) foi estatisticamente semelhante entre os grupos experimentais. Ainda em machos, a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do aparato foi maior nos animais avaliados com 3 meses e que nasceram de mães que receberam DEX no período pré-natal ( $p=0,01$ ;  $F_{1,33}= 7,22$ ;  $r^2=17,73$ ; Figura 12D) quando comparados ao grupo CTL. Ainda nesse aspecto, não foram observadas influências da administração gestacional com VD. Esse efeito da DEX parece ser transitório, uma vez que desaparece nos machos avaliados aos 6 meses. Contudo, nessa idade, os resultados da ANOVA mostraram um efeito da VD ( $p=0,01$ ;  $F_{1,32}= 6,25$ ;  $r^2=15,54$ , Figura 12E), porém a análise do pós-teste não confirmou essa diferença, visto que os grupos CTL e VD foram estatisticamente similares. Ainda com relação a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos, tanto os efeitos da DEX quanto da VD evidenciados em idades anteriores, desapareceram nos animais com 12 meses de idade, considerando que os grupos foram estatisticamente similares nessa idade (Figura 12F). Com relação a porcentagem de entrada nos braços abertos, não houve diferença

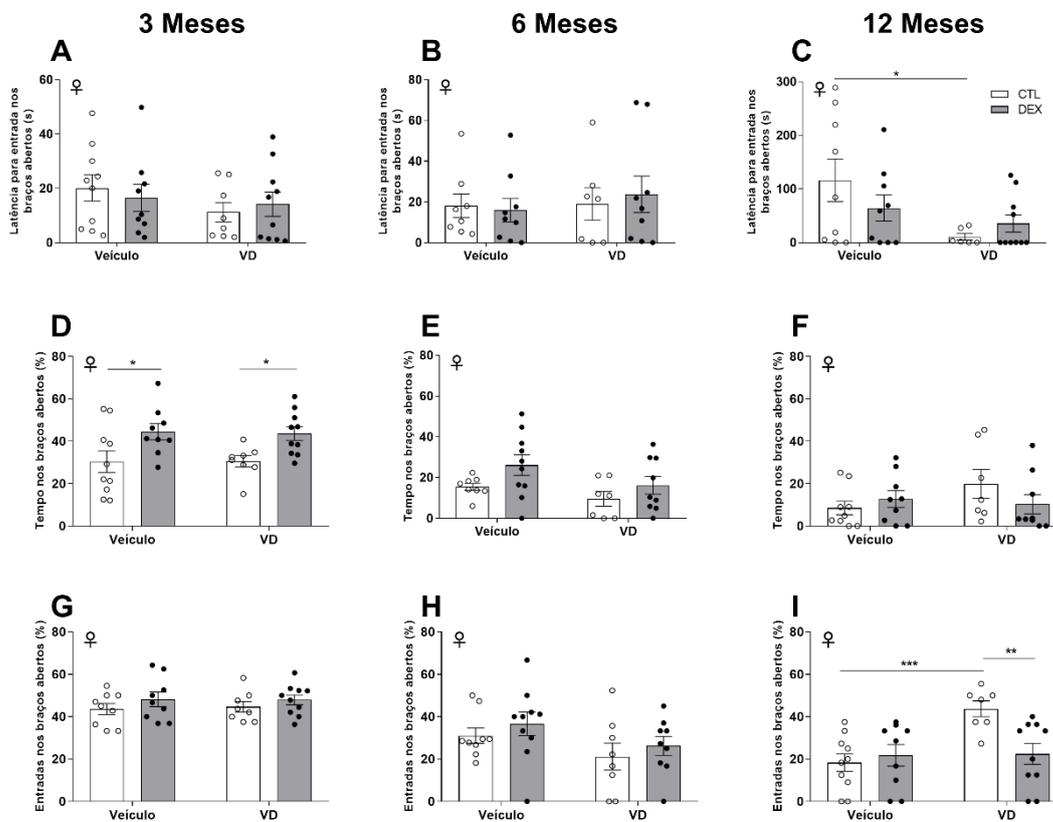
significante aos 3, 6 e 12 (Figura 12 G, H e I, respectivamente) meses entre os grupos experimentais.



**Figura 13.** Latência para entrada nos braços abertos do labirinto avaliada aos 3 (A), 6 (B) e 12 (C) meses. Porcentagem de tempo gasto nos braços aberto do labirinto avaliada aos 3 (D), 6 (E) e 12 (F) e porcentagem de entrada os braços abertos do labirinto aos 3 (G), 6 (H) e 12 (I) meses, em machos nascidos de mães tratadas com DEX (barras cinzas) ou não (barras brancas) administrado com VD (VD) ou óleo (Veículo). ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média ± SEM.  $P < 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ .

Os parâmetros observados no labirinto em cruz elevado também foram avaliados em fêmeas. Com relação a latência para entrada nos braços abertos, não houve diferença significativa entre os grupos estudados aos 3 e 6 meses (Figura 14 A e B, respectivamente). Já aos 12 meses, a administração gestacional com VD promoveu diminuição desse parâmetro ( $p=0,01$ ;  $F_{1,30}= 6,14$ ;  $r^2=16,10$ , Figura 14C). A porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto foi maior em fêmeas avaliadas aos 3 ( $p=0,011$ ;  $F_{1,33}= 11,79$ ;  $r^2=26,26$ , Figura 14D) e 6 meses ( $p=0,04$ ;  $F_{1,30}= 4,30$ ;  $r^2=11,17$ , Figura 14E) e que nasceram de mães expostas à administração pré-natal de DEX, porém aos 6 meses, o pós teste não confirmou essa diferença, uma vez que os grupos CTL e DEX foram estatisticamente similares ( $p=0,07$ ). Ainda com relação a esse parâmetro, os resultados de 12 meses mostram que os efeitos da DEX são

transitórios, já que não houve diferença significativa entre os grupos estudados (Figura 42F). Com relação a porcentagem de entradas nos braços abertos, a análise estatística mostrou que não há diferença significativa entre as fêmeas avaliadas aos 6 e 12 meses (Figura 14 G e H, respectivamente). Porém, quando avaliadas aos 12 meses, os resultados da ANOVA mostraram um efeito significativo da VD ( $p=0,0084$ ;  $F_{1,32}= 7,86$ ;  $r^2=16,38$ , Figura 14I) e também uma interação entre os fatores DEX e VD ( $p=0,01$ ;  $F_{1,32}= 7,01$ ;  $r^2=14,61$ , Figura 14I), mostrando que a administração gestacional de VD promoveu um aumento na porcentagem de entrada nos braços abertos e o tratamento pré-natal com DEX impediu esse aumento, como comprovado pelos resultados do pós-teste.



**Figura 14.** Latência para entrada nos braços abertos do labirinto avaliada aos 3 (A), 6 (B) e 12 (C) meses. Porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto avaliada aos 3 (D), 6 (E) e 12 (F) e porcentagem de entrada os braços abertos do labirinto aos 3 (G), 6 (H) e 12 (I) meses em fêmeas nascidas de mães tratadas com DEX (barras cinzas) ou não (barras brancas) administrado com VD (VD) ou óleo (Veículo). ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM.  $P < 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,009$ , \*\*\*  $p \leq 0,0009$ .

Ainda, foram avaliadas as variáveis etológicas no labirinto em cruz elevado em machos e fêmeas aos 3, 6 e 12 meses de idade. Com relação a exploração vertical (EV), imersão de cabeça (IC) e autolimpeza (AL), não houve diferença significativa entre os grupos de machos ou de fêmeas avaliados aos 3 e 6 meses pós-natal (Tabela 3 e 4,

respectivamente). Já aos 12 meses (Tabela 5), em machos, a EV e IC foram estatisticamente similares entre os grupos experimentais, enquanto a administração gestacional com VD ( $p=0,003$ ;  $F_{1,23}= 10,32$ ;  $r^2=30,02$ , Tabela 5) promoveu redução na frequência de AL, como confirmado pelos resultados do pós-teste pela diferença entre os grupos CTL e VD ( $p=0,02$ ), bem como entre DEX e DVD ( $p=0,04$ ). Os resultados obtidos pela avaliação desses parâmetros em fêmeas mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos estudados com relação a EV e AL, contudo a ANOVA mostrou um efeito da DEX no que diz respeito a IC ( $p=0,02$ ;  $F_{1,26}= 6,10$ ;  $r^2=17,89$ , Tabela 5), porém esses resultados não foram confirmados pelo pós-teste, uma vez que os grupos CTL e DEX foram estatisticamente similares.

**Tabela 3.** Variáveis etológicas avaliadas no LCE. Exploração vertical (EV); Imersão de cabeça (IC) e autolimpeza (AL) em machos e fêmeas com 3 meses de idade, nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrados com VD ou óleo. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SD.  $P<0,05$ .

<b>3 Meses</b>	<b>CTL ♂</b>	<b>DEX ♂</b>	<b>VD ♂</b>	<b>DVD ♂</b>	<b>Valor de p</b>
<i>EV</i>	14,3 $\pm$ 1,1	13,6 $\pm$ 1,1	15,5 $\pm$ 1,7	15,2 $\pm$ 1,5	NS
<i>IC</i>	6,3 $\pm$ 1	8,1 $\pm$ 1,3	7 $\pm$ 0,7	6 $\pm$ 1,1	NS
<i>AL</i>	0,7 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,2	NS
	<b>CTL ♀</b>	<b>DEX ♀</b>	<b>VD ♀</b>	<b>DVD ♀</b>	<b>Valor de p</b>
<i>EV</i>	13,1 $\pm$ 1,3	14,3 $\pm$ 0,9	13,8 $\pm$ 0,6	15,8 $\pm$ 0,9	NS
<i>IC</i>	4,7 $\pm$ 0,8	6,2 $\pm$ 0,9	8,5 $\pm$ 1,5	6,6 $\pm$ 0,8	NS
<i>AL</i>	0,7 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,2	NS

**Tabela 4.** Variáveis etológicas avaliadas no LCE. Exploração vertical (EV); Imersão de cabeça (IC) e autolimpeza (AL) em machos e fêmeas com 6 meses de idade, nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrados com VD ou óleo. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SD.  $P<0,05$ .

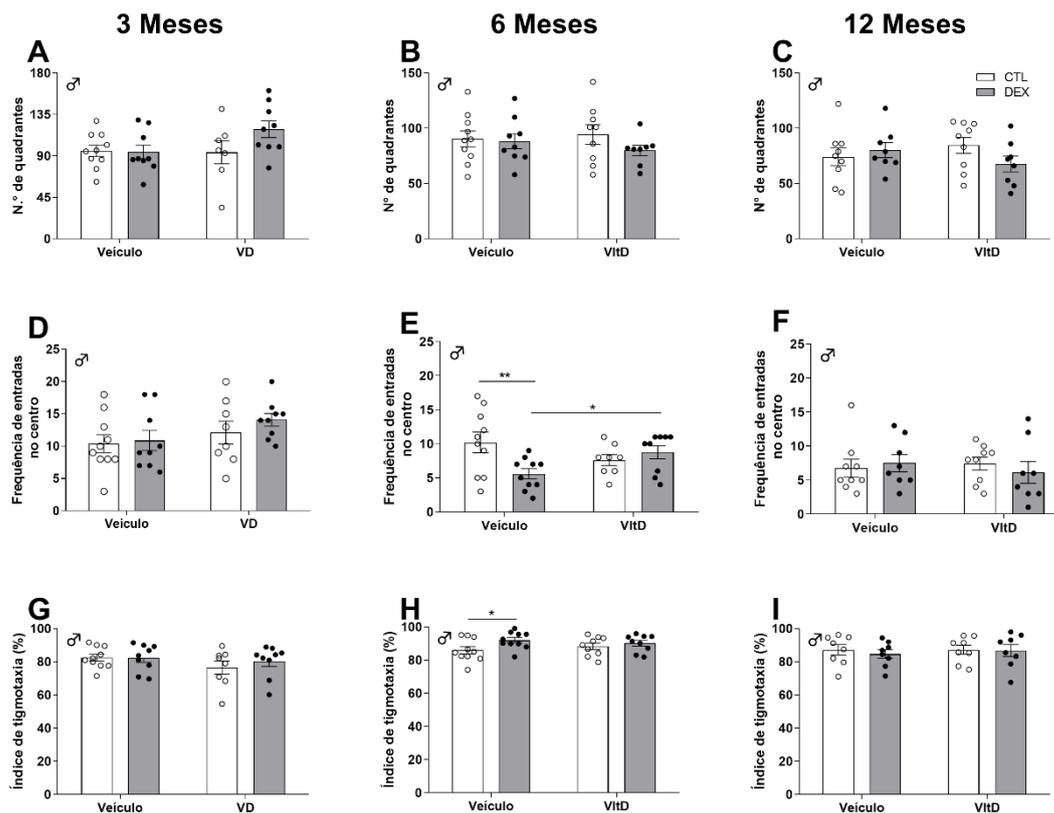
<b>6 Meses</b>	<b>CTL ♂</b>	<b>DEX ♂</b>	<b>VD ♂</b>	<b>DVD ♂</b>	<b>Valor de p</b>
<i>EV</i>	15,5 $\pm$ 1,5	12,5 $\pm$ 1,2	13,5 $\pm$ 1,3	16 $\pm$ 1,7	NS
<i>IC</i>	2,9 $\pm$ 0,8	2 $\pm$ 0,5	1,8 $\pm$ 0,7	1,7 $\pm$ 0,6	NS
<i>AL</i>	1,9 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,4	2,6 $\pm$ 0,8	2,2 $\pm$ 0,4	NS
	<b>CTL ♀</b>	<b>DEX ♀</b>	<b>VD ♀</b>	<b>DVD ♀</b>	<b>Valor de p</b>
<i>EV</i>	16 $\pm$ 1,6	15,8 $\pm$ 1,9	17,8 $\pm$ 1,9	19,2 $\pm$ 0,8	NS
<i>IC</i>	2 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,8	2,4 $\pm$ 0,8	3,4 $\pm$ 0,9	NS
<i>AL</i>	2 $\pm$ 0,5	2,4 $\pm$ 0,3	2 $\pm$ 0,5	3,1 $\pm$ 0,8	NS

**Tabela 5.** Variáveis etológicas avaliadas no LCE. Exploração vertical (EV); Imersão de cabeça (IC) e autolimpeza (AL) em machos e fêmeas com 12 meses de idade, nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrados com VD ou óleo. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SD. P<0,05. @diferença entre os grupos CTL e DEX; §diferença entre os grupos VD e DVD.

<b>12 Meses</b>	<b>CTL ♂</b>	<b>DEX ♂</b>	<b>VD ♂</b>	<b>DVD ♂</b>	<b>Valor de p</b>
<i>EV</i>	13,5 $\pm$ 1,9	13,3 $\pm$ 1	16,1 $\pm$ 2,2	17,5 $\pm$ 2,2	NS
<i>IC</i>	2,1 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,6	2,3 $\pm$ 0,8	2,5 $\pm$ 0,9	NS
<i>AL</i>	2,5 $\pm$ 0,6	2 $\pm$ 0,8@	0,8 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2 <sup>s</sup>	p<0,05
	<b>CTL ♀</b>	<b>DEX ♀</b>	<b>VD ♀</b>	<b>DVD ♀</b>	<b>Valor de p</b>
<i>EV</i>	16,6 $\pm$ 1,3	15,5 $\pm$ 1,6	13 $\pm$ 0,9	16,1 $\pm$ 2,9	NS
<i>IC</i>	2 $\pm$ 0,6	0,5 $\pm$ 0,2	3 $\pm$ 0,9	1,5 $\pm$ 0,3	NS
<i>AL</i>	21,1 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,2	1 $\pm$ 0,2	NS

#### 4.3.2. Teste de campo aberto

A locomoção dos animais foi avaliada através do número de quadrantes percorridos na arena de campo aberto. Com relação a esse parâmetro, não houve diferença significativa entre machos avaliados aos 3, 6 e 12 meses pós-natal (Figura 15A, B e C, respectivamente). A frequência de entrada nos quadrantes centrais da arena também foi avaliada e a análise estatística mostrou que em machos aos 3 meses os grupos experimentais foram similares estatisticamente (Figura 15D). Contudo, quando avaliados aos 6 meses de idade, os resultados da ANOVA mostraram interação significativa entre os fatores DEX e VD ( $p=0,01$ ;  $F_{1,33}= 7$ ;  $r^2=16,15$ , Figura 15E) mostrando que a administração gestacional com VD foi capaz de impedir a redução na frequência de entrada nos quadrantes centrais da arena, induzida pela administração pré-natal de DEX. Esse resultado foi confirmado pelo pós-teste, que mostrou diferença significativa entre os grupos CTL e DEX ( $p=0,003$ ) e entre os grupos DEX e DVD ( $p=0,04$ ). Esse efeito visto aos 6 meses, parece ser transitório, uma vez que aos 12 meses não houve diferença significativa entre os grupos estudados (Figura 15F). Resultados similares foram vistos quanto ao índice de tigmotaxia. No 3° e 12° mês pós-natal (Figura 15G e I, respectivamente) não houve diferença significativa entre os grupos estudados, contudo, no 6° mês a administração pré-natal de DEX promoveu um aumento desse parâmetro ( $p=0,04$ ;  $F_{1,34}= 4,38$ ;  $r^2=10,99$ , Figura 15H), como mostrado pela diferença entre os grupos CTL e DEX ( $p=0,02$ ) no resultado do pós-teste.



**Figura 15.** Número de quadrantes percorridos na arena de campo aberto aos 3 (A), 6 (B) e 12 (C) meses. Frequência de entrada nos quadrantes centrais da arena avaliada aos 3 (D), 6 (E) e 12 (F) e índice de tigmotaxia avaliada aos 3 (G), 6 (H) e 12 (I) meses em machos nascidos de mães tratadas com DEX (barras cinzas) ou não (barras brancas) administrado com VD (VD) ou óleo (Veículo). ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM.  $P < 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,009$ .

O teste de campo aberto também foi realizado em fêmeas no 3º, 6º e 12º mês pós-natal (Figura 16). Aos 3 meses a ANOVA revelou uma interação entre os fatores DEX e VD ( $p=0,003$ ;  $F_{1,31}=4,38$ ;  $r^2=22,01$ , Figura 16A), levando a um aumento no número de quadrantes percorridos nos animais que nasceram de mães tratadas com DEX e administradas com VD, como mostrado pela diferença evidenciada pelo pós teste entre os grupos DEX e DVD ( $p=0,002$ ) e entre os grupos VD e DVD ( $p=0,004$ ). Aos 6 meses também houve interação entre os fatores DEX e VD ( $p=0,0007$ ;  $F_{1,30}=14,18$ ;  $r^2=31,28$ , Figura 16B), contudo o pós teste mostrou que a administração gestacional com VD diminuiu o número de quadrantes percorridos, quando comparado ao grupo CTL ( $p=0,006$ ), mas o tratamento pré-natal com DEX impediu essa redução ( $p=0,001$ , VD vs DVD). No entanto, quando esse parâmetro foi avaliado aos 12 meses, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (Figuras 16C), mostrando que as alterações vistas com 3 e 6 meses parecem ser transitórias.

A frequência de entrada nos quadrantes centrais da arena foi estatisticamente similar em fêmeas avaliadas aos 3 e 12 meses de idade (Figura 16D e F). Contudo, quando avaliadas no 6º mês, os resultados da ANOVA mostraram interação significativa entre os fatores DEX e VD ( $p=0,0002$ ;  $F_{1,31}= 18,49$ ;  $r^2=6,86$ , Figura 16E) e o pós-teste evidenciou que tanto o tratamento pré-natal com DEX quanto a administração gestacional com VD diminuíram a frequência de entrada nos quadrantes centrais da arena quando comparados ao grupo CTL ( $p=0,0008$  e  $<0,0001$ , respectivamente). Contudo a interação entre os dois fatores foi capaz de prevenir essa redução, como mostrado pela diferença entre os grupos VD e DVD ( $p=0,02$ ).

Com relação ao índice de tigmotaxia, não houve diferença significativa entre as fêmeas avaliadas aos 3 meses de idade (Figura 16G). Já no 6º mês, houve um efeito do tratamento pré-natal com DEX causando aumento nesse parâmetro ( $p=0,008$ ;  $F_{1,31}= 7,92$ ;  $r^2=16,01$ , Figura 16H), e além disso, houve interação significativa entre os fatores DEX e VD, mostrando que a administração gestacional com VD impediu o aumento desse parâmetro ( $p=0,005$ ;  $F_{1,31}= 8,89$ ;  $r^2=17,97$ , Figura 16H). Ainda sobre o índice de tigmotaxia, aos 12 meses, os resultados da ANOVA mostraram interação entre os fatores DEX e VD ( $p=0,008$ ;  $F_{1,30}= 7,88$ ;  $r^2=18,88$ , Figura 16I) e o pós-teste evidenciou que fêmeas que nasceram de mães administradas com VD apresentaram redução desse parâmetro quando comparadas ao grupo CTL ( $p=0,01$ ). Entretanto, quando nascidas de mães que receberam os dois tratamentos, essa redução não aconteceu, como mostrado pela diferença entre os grupos VD e DVD ( $p=0,002$ ).

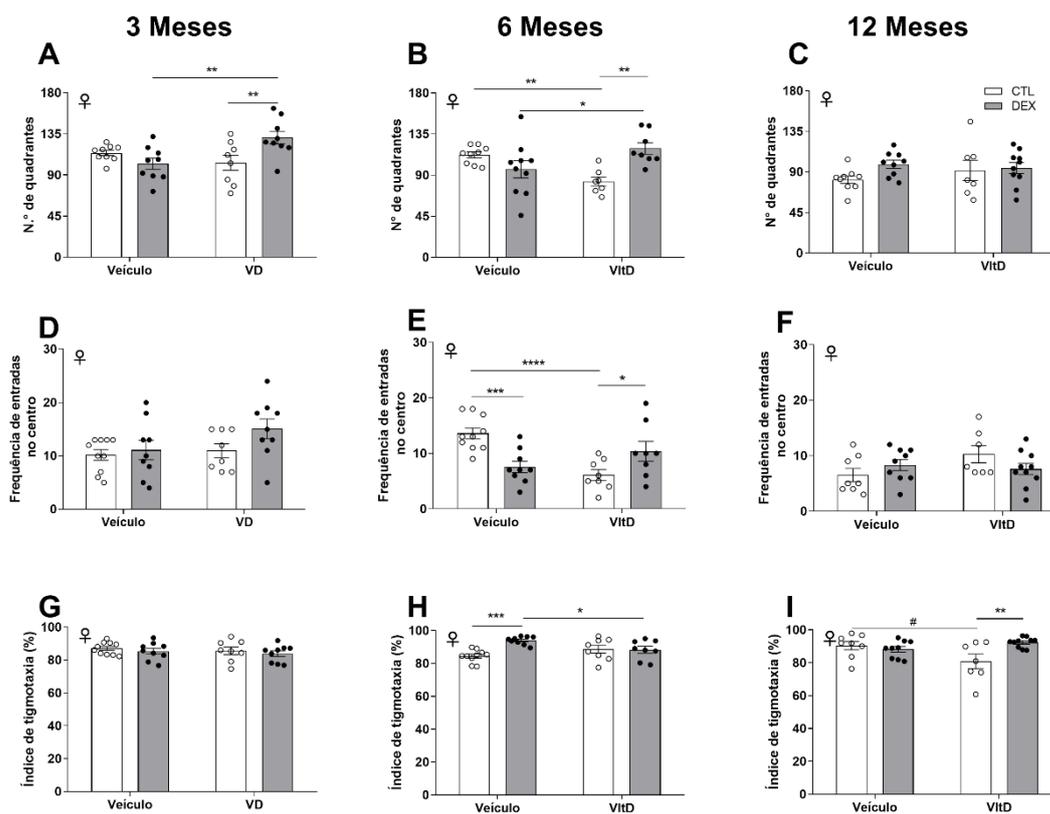


Figura 16. Número de quadrantes percorridos na arena de campo aberto aos 3 (A), 6 (B) e 12 (C) meses. Frequência de entrada nos quadrantes centrais da arena avaliada aos 3 (D), 6 (E) e 12 (F) e índice de tigmotaxia avaliada aos 3 (G), 6 (H) e 12 (I) meses em fêmeas nascidas de mães tratadas com DEX (barras cinzas) ou não (barras brancas) administrado com VD (VD) ou óleo (Veículo). ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM.  $P < 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,009$ , \*\*\*  $p < 0,0009$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

As variáveis etológicas de autolimpeza e exploração vertical também foram avaliadas no campo aberto aos 3, 6 e 12 meses de idade (Tabelas 6, 7 e 8, respectivamente). Com relação a autolimpeza, avaliada em machos aos 3 meses, não houve diferença significativa entre os grupos estudados (Tabela 8). Já aos 6 meses, os resultados da ANOVA mostraram um efeito da VD ( $p=0,02$ ;  $F_{1,32}= 5,33$ ;  $r^2=18,88$ ; Tabela 7), porém essa diferença não foi confirmada pelo pós-teste, uma vez que os grupos CTL e VD foram estatisticamente similares. Aos 12 meses a ANOVA também mostrou um efeito da VD ( $p=0,01$ ;  $F_{1,29}= 7,35$ ;  $r^2=17,92$ ; Tabela 8), e o pós teste confirmou que a administração gestacional com VD reduziu a frequência de autolimpeza quando comparado ao grupo CTL ( $p=0,002$ ). Com relação a exploração vertical, avaliada em machos aos 3 meses, a ANOVA mostrou um efeito da VD ( $p=0,005$ ;  $F_{1,33}= 8,7$ ;  $r^2=19,24$ ; Tabela 6), porém esse efeito não foi confirmado pelo pós-teste, visto que os grupos CTL e VD foram estatisticamente similares. Aos 6 meses, a análise estatística

mostrou que o tratamento pré-natal com DEX ( $p < 0,0001$ ;  $F_{1,31} = 33,28$ ;  $r^2 = 40,57$ ; Tabela 7) diminuiu a frequência de exploração vertical no campo aberto e que houve uma interação entre DEX e VD ( $p = 0,0008$ ;  $F_{1,31} = 13,75$ ;  $r^2 = 16,76$ ; Tabela 7), mostrando que a administração gestacional com VD impediu a redução desse parâmetro. Já aos 12 meses, a ANOVA mostrou um efeito da VD ( $p = 0,02$ ;  $F_{1,29} = 5,73$ ;  $r^2 = 14,44$ ; Tabela 8), porém esse efeito não foi confirmado pelo pós-teste, uma vez que os grupos CTL e VD são estatisticamente similares.

A autolimpeza e exploração também foram avaliadas em fêmeas aos 3, 6 e 12 meses. Com relação a autolimpeza, aos 3 meses não houve diferença estatística entre os grupos estudados (Tabela 6). Contudo, no 6º mês o tratamento pré-natal com DEX ( $p = 0,04$ ;  $F_{1,30} = 4,22$ ;  $r^2 = 9,26$ ; Tabela 7) promoveu aumento na frequência de autolimpeza e a administração com VD foi capaz de atenuar esse aumento, como mostrado pelos resultados de interação entre os fatores DEX e VD ( $p = 0,005$ ;  $F_{1,30} = 8,83$ ;  $r^2 = 19,38$ ; Tabela 7). Já aos 12 meses, tanto o tratamento pré-natal com DEX ( $p = 0,02$ ;  $F_{1,29} = 5,89$ ;  $r^2 = 13,85$ ; Tabela 8) quanto a administração gestacional com VD, isoladamente, reduziram a frequência de autolimpeza, como mostrado pela diferença entre CTL e DEX e entre CTL e VD nos resultados do pós-teste. Com relação a exploração vertical em fêmeas, não houve diferença significativa entre os grupos estudados aos 3 meses de idade (Tabela 6). Contudo aos 6 ( $p = 0,002$ ;  $F_{1,32} = 10,61$ ;  $r^2 = 24,04$ ; Tabela 7) e 12 meses ( $p = 0,02$ ;  $F_{1,31} = 5,75$ ;  $r^2 = 14,87$ ; Tabela 8), houve interação significativa entre os fatores DEX e VD, mostrando que o tratamento pré-natal com DEX diminuiu a frequência de exploração vertical do campo aberto e que a administração gestacional com VD impediu a alteração desse parâmetro, como mostrado pela diferença entre os grupos CTL e DEX e entre os grupos DEX e DVD no pós-teste.

**Tabela 6.** Variáveis etológicas avaliadas no campo aberto. Autolimpeza (AL) e exploração vertical (EV) em machos e fêmeas com 3 meses de idade, nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrados com VD ou óleo. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SD.  $P < 0,05$ .

<b>3 Meses</b>	<b>CTL ♂</b>	<b>DEX ♂</b>	<b>VD ♂</b>	<b>DVD ♂</b>	<b>Valor de p</b>
<i>AL</i>	1 $\pm$ 0,6	0,7 $\pm$ 1,3	0,7 $\pm$ 0,8	0,8 $\pm$ 0,7	NS
<i>EV</i>	24,4 $\pm$ 6	18,1 $\pm$ 6,8	27,7 $\pm$ 5,4	26,8 $\pm$ 6	NS
	<b>CTL ♀</b>	<b>DEX ♀</b>	<b>VD ♀</b>	<b>DVD ♀</b>	<b>Valor de p</b>
<i>AL</i>	0,5 $\pm$ 0,5	0,3 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,4	1 $\pm$ 1,1	NS
<i>EV</i>	26 $\pm$ 6,7	26,5 $\pm$ 6,6	25,5 $\pm$ 4,7	30,4 $\pm$ 3,7	NS

**Tabela 7.** Variáveis etológicas avaliadas no campo aberto. Autolimpeza (AL) e exploração vertical (EV) em machos e fêmeas com 6 meses de idade, nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrados com VD ou óleo. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SD.  $P < 0,05$ . @diferença entre os grupos CTL e DEX; &diferença entre os grupos DEX e DVD.

<b>6 Meses</b>	<b>CTL ♂</b>	<b>DEX ♂</b>	<b>VD ♂</b>	<b>DVD ♂</b>	<b>Valor de p</b>
<i>AL</i>	1 $\pm$ 1,5	0,3 $\pm$ 0,5	1,7 $\pm$ 1,9	1,6 $\pm$ 1,4	NS
<i>EV</i>	25 $\pm$ 6,2	11,7 $\pm$ 3,1@	20,37 $\pm$ 2,2	17,5 $\pm$ 2,7&	$p < 0,05$
	<b>CTL ♀</b>	<b>DEX ♀</b>	<b>VD ♀</b>	<b>DVD ♀</b>	<b>Valor de p</b>
<i>AL</i>	0,3 $\pm$ 0,5	1,9 $\pm$ 1,2@	1 $\pm$ 0,9	0,7 $\pm$ 0,4&	$p < 0,05$
<i>EV</i>	28,4 $\pm$ 8,8	17,8 $\pm$ 6,7@	19,3 $\pm$ 7,5	25,6 $\pm$ 7,4&	$p < 0,05$

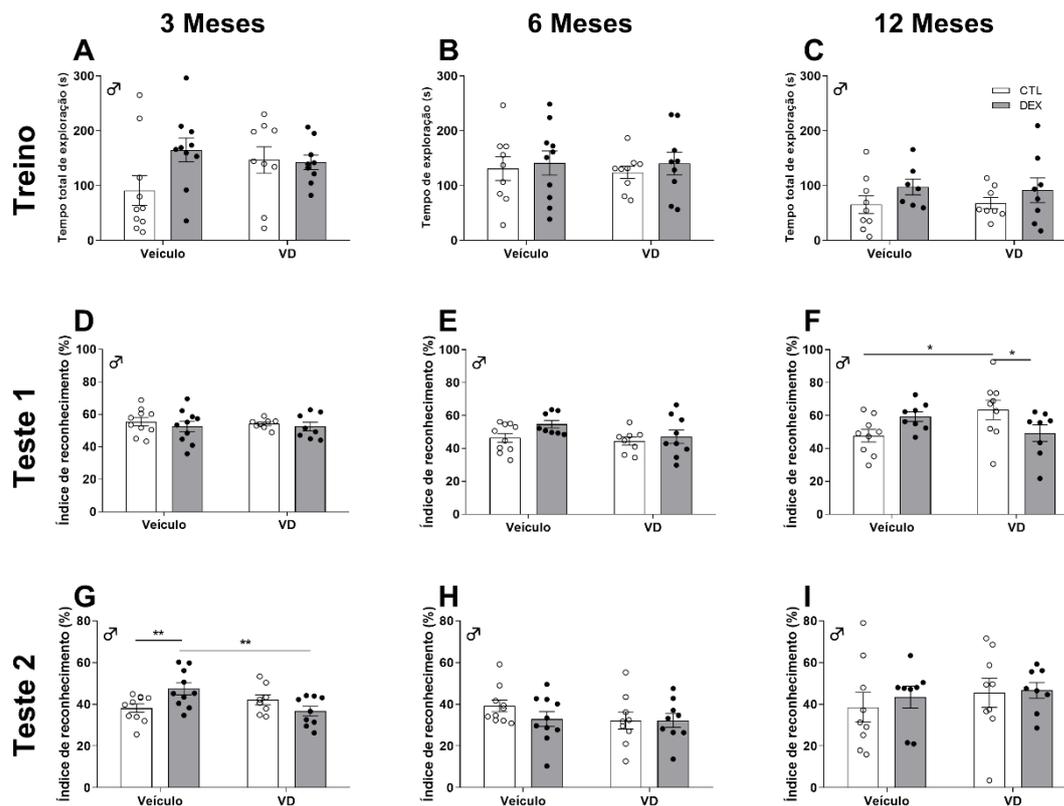
**Tabela 8.** Variáveis etológicas avaliadas no campo aberto. Autolimpeza (AL) e exploração vertical (EV) em machos e fêmeas com 12 meses de idade, nascidos de mães tratadas com DEX ou não, administrados com VD ou óleo. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SD.  $P < 0,05$ . @diferença entre os grupos CTL e DEX; &diferença entre os grupos DEX e DVD; #diferença entre os grupos CTL e VD.

<b>12 Meses</b>	<b>CTL ♂</b>	<b>DEX ♂</b>	<b>VD ♂</b>	<b>DVD ♂</b>	<b>Valor de p</b>
<i>AL</i>	2,3 $\pm$ 1,8	1,2 $\pm$ 0,7	0,5 $\pm$ 0,5#	0,8 $\pm$ 0,8	$p < 0,05$
<i>EV</i>	13,5 $\pm$ 6,1	14,8 $\pm$ 6,8	12,6 $\pm$ 5,2	6,5 $\pm$ 3,4	NS
	<b>CTL ♀</b>	<b>DEX ♀</b>	<b>VD ♀</b>	<b>DVD ♀</b>	<b>Valor de p</b>
<i>AL</i>	2,4 $\pm$ 2,1	1,1 $\pm$ 0,6@	1,1 $\pm$ 0,65#	0,3 $\pm$ 0,5	$p < 0,05$
<i>EV</i>	17,1 $\pm$ 5,4	11,2 $\pm$ 2,7@	14,4 $\pm$ 7,7	18,1 $\pm$ 6,65&	$p < 0,05$

### 4.3.3. Teste de reconhecimento de objetos

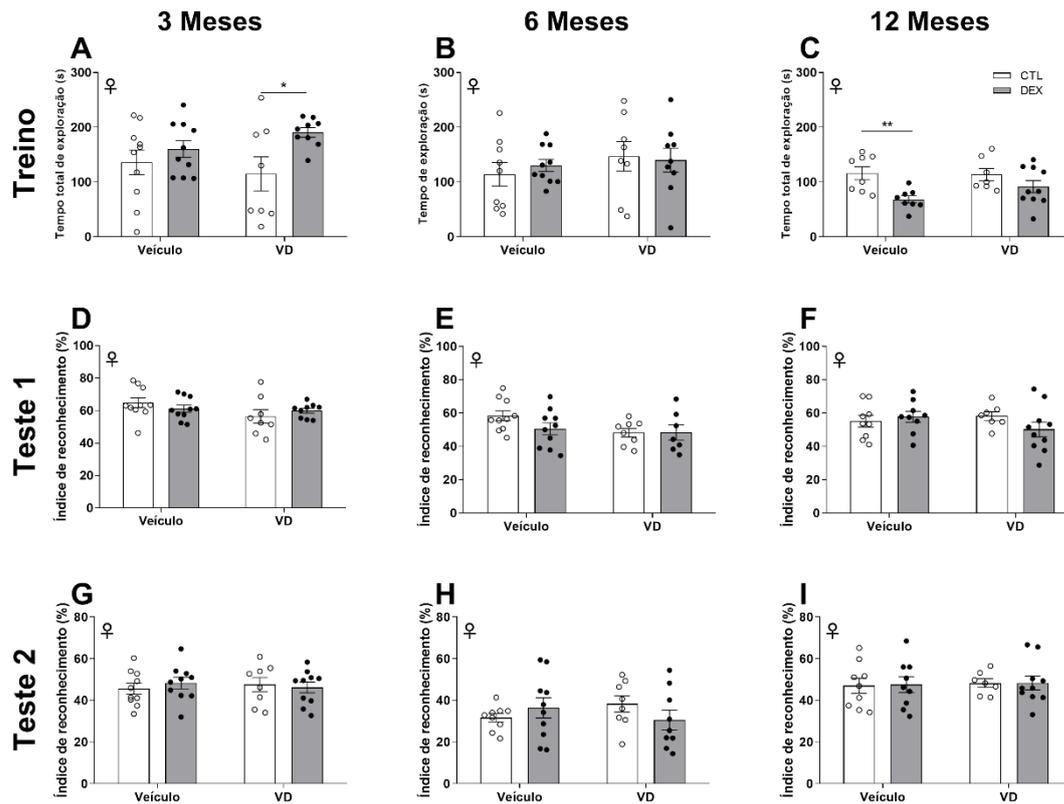
O tempo de exploração total do objeto, obtido durante a sessão de treino foi estatisticamente similar entre machos avaliados aos 3, 6 e 12 meses pós-natal (Figura 17A, B e C, respectivamente). O índice de reconhecimento (IR) foi estatisticamente similar em machos no 3° e 6° mês pós-natal (Figura 17 D e E). Contudo, quando esse parâmetro foi avaliado no 12° mês, os resultados da ANOVA mostraram uma interação significativa entre os fatores DEX e VD ( $p=0,009$ ;  $F_{1,30}= 7,8$ ;  $r^2=20,28$ ; Figura 17F). O pós-teste mostrou que a administração gestacional com VD aumentou o IR quando comparado ao grupo CTL ( $p=0,01$ ) e que o tratamento pré-natal impediu o aumento deste parâmetro ( $p=0,03$ ).

Já em relação ao IR na sessão de teste 2, a ANOVA mostrou uma interação significativa entre os fatores DEX e VD ( $p=0,005$ ;  $F_{1,33}= 9,06$ ;  $r^2=20,02$ ; Figura 17G) aos 3 meses em machos. Os resultados do pós-teste confirmaram que a exposição pré-natal à DEX promoveu aumento no IR quando comparado ao grupo CTL ( $p=0,008$ ) e que a administração gestacional com VD atenuou esse aumento ( $p=0,003$ ). Contudo, essa alteração parece ser transitória, uma vez que no 6° (Figura 17H) e 12° (Figura 17I) mês pós-natal, não houve diferença significativa no IR na sessão de teste 2.



**Figura 17.** Tempo de exploração de objetos na sessão de treino, aos 3 (A), 6 (B) e 12 (C) meses. Índice de reconhecimento do objeto novo na sessão de teste 1 aos 3 (D), 6 (E) e 12 (F) meses e índice de reconhecimento do objeto novo na sessão de teste 2 aos 3 (G), 6 (H) e 12 (I) meses em machos nascidos de mães tratadas com DEX (barras cinzas) ou não (barras brancas) administrado com VD (VD) ou óleo (Veículo). ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM.  $P < 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,009$ .

Os resultados do teste de reconhecimento de objetos em fêmeas, mostraram que aos 3 meses, houve um efeito da DEX ( $p=0,01$ ;  $F_{1,33}= 5,99$ ;  $r^2=14,91$ ; Figura 18A) no tempo de exploração do objeto na sessão de treino, contudo os resultados do pós-teste não confirmaram essa diferença, uma vez que os grupos CTL e DEX foram estatisticamente similares. Além disso, quando esse parâmetro foi avaliado no 6°, não houve diferença significativa entre os grupos estudados (Figura 18B). Já no 12° mês, a ANOVA mostrou um efeito da DEX causando diminuição do tempo de exploração do objeto na sessão de treino ( $p=0,002$ ;  $F_{1,29}= 10,93$ ;  $r^2=26,03$ ; Figura 18C), como confirmado pela diferença entre os grupos CTL e DEX nos resultados do pós-teste ( $p=0,003$ ). Com relação ao tempo de exploração na sessão de treino 1 em fêmeas, aos 3, 6 e 12 meses de idade (Figuras 18D, E e F, respectivamente) e na sessão de treino 2 (Figuras 18G, H e I, respectivamente), não houve diferença estatística entre os grupos estudados.

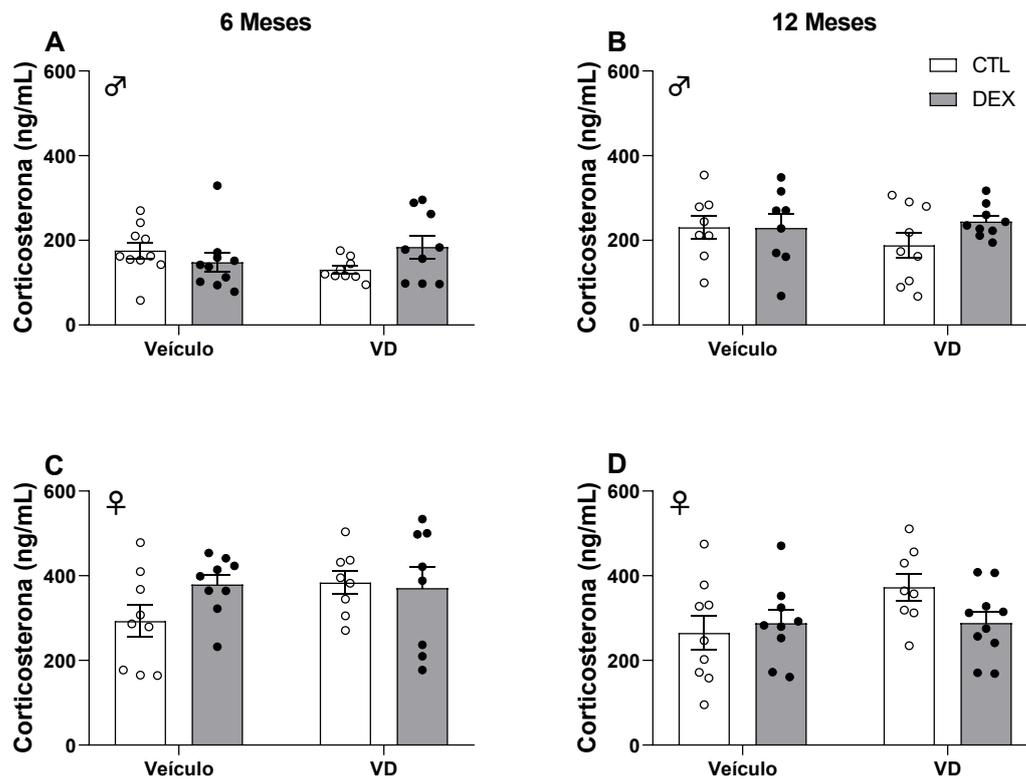


**Figura 18.** Tempo de exploração de objetos na sessão de treino, aos 3 (A), 6 (B) e 12 (C) meses. Índice de reconhecimento do objeto novo na sessão de teste 1 aos 3 (D), 6 (E) e 12 (F) meses e índice de reconhecimento do objeto novo na sessão de teste 2 na sessão de teste 2 aos 3 (G), 6 (H) e 12 (I) meses em fêmeas nascidas de mães tratadas com DEX (barras cinzas) ou não (barras brancas) administrado com VD (VD) ou óleo (Veículo). ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM.  $P < 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,009$ .

#### 4.4. Dosagem hormonal

##### 4.4.1 Corticosterona

Com relação a quantificação plasmática de corticosterona, não houve diferença significativa entre os grupos estudados aos 6 e 12 meses, independentemente do sexo (Figura 19).



**Figura 19.** Concentração plasmática de corticosterona aos 6 (A e C) e 12 (B e D) meses em machos (A e B) e fêmeas (C e D) nascidas de mães tratadas com DEX (barras cinzas) ou não (barras brancas) administrado com VD (VD) ou óleo (Veículo). ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM.  $P < 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que a exposição pré-natal à DEX causou prejuízos em parâmetros metabólicos e comportamentais de modo dependente da idade e sexo dos animais. De maneira geral a prole masculina se mostrou mais suscetível aos efeitos epigenéticos deletérios da DEX em comparação à prole feminina. Da mesma forma, podemos considerar que os machos também se beneficiaram mais dos efeitos protetores da administração gestacional de VD do que as fêmeas.

### 5.1. Parâmetros desenvolvimentais

Os dados mostraram que a exposição à DEX no terço final da gestação aboliu o ganho de peso das gestantes durante o tratamento e reduziu o peso e comprimento craniocaudal da prole ao nascer, além de comprometer o desenvolvimento físico e de reflexos. A redução no ganho de peso das gestantes durante o tratamento com DEX, deve-se, pelo menos em parte, a menor ingestão de alimento observada no presente trabalho. Esses resultados estão de acordo com dados prévios que mostram que a administração de DEX em uma dose maior (0,2 mg/kg) durante o terço final da gestação abole o ganho de peso e reduz a ingestão alimentar (Motta *et al.*, 2018). Além disso, Battiston e colaboradores (2017) demonstraram que a administração de 1mg/kg de DEX promove redução de peso e ingestão alimentar em fêmeas. O tratamento com DEX altera o controle hipotalâmico da ingestão alimentar por regular a expressão de neurotransmissores e neuropeptídeos. Chruvattil e colaboradores (2017) demonstraram que a administração de DEX em fêmeas na dose de 3mg/kg durante 28 dias, resistência hipotalâmica à insulina, fato que pode ter contribuído para a redução de peso e ingestão alimentar vista em nosso trabalho. Adicionalmente, o catabolismo proteico também pode ter influenciado essa resposta, uma vez que o tratamento com DEX induz a expressão de proteínas relacionadas a via da ubiquitina, principal via envolvida no catabolismo de proteínas miofibrilares (Scott e Schekman *et al.*, 2008).

A administração com VD não influenciou o peso e ingestão alimentar das gestantes. Entretanto, já foi demonstrado em outros contextos, que a VD pode afetar o ganho de peso. Ela parece atenuar o ganho de peso em ratos submetidos à dieta hipercalórica (Yin *et al.*, 2009; Gomaa e El-Aziz, 2017), provavelmente por supra regular enzimas envolvidas na oxidação de ácidos graxos (Marcotorchino *et al.*, 2014) e também por elevar os níveis séricos de leptina, o que diminui o conteúdo intracelular de

triglicéridos e conseqüentemente promove redução de peso (Ghavamzadeh, Mobasseri e Mahdavi, 2014). No presente estudo, a não redução de peso, apenas a abolição do ganho de peso das gestantes, mesmo em um contexto catabólico induzido pela DEX e VD pode ser, em parte, explicada pela presença dos hormônios gestacionais progesterona e prolactina que são conhecidos por induzir a hiperfagia e ganho de peso (Trujillo *et al.*, 2011).

A suspensão do ganho de peso das gestantes também pode ter sido influenciada pelos efeitos da DEX na placenta, o que pode causar redução na invasão e proliferação trofoblástica com conseqüente inibição do desenvolvimento placentário, acarretando em má nutrição fetal e redução do peso da prole ao nascer (Mandl *et al.*, 2006). O presente trabalho, assim como a literatura (Zhou *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2017) mostrou redução no peso da prole de mães que foram expostas ao tratamento com DEX no terço final da gestação.

Apesar dos dados em humanos mostrarem que a administração pré-natal com VD está associada a aumento do peso ao nascer (Sablok *et al.*, 2015; Zerofsky *et al.*, 2016; Sahoo *et al.*, 2017), o presente trabalho não foi capaz de confirmar este dado em roedores. A melhora do peso ao nascer parece estar relacionada com o período de início da administração com VD, sendo significativo somente quando iniciada tardiamente (Bi *et al.*, 2018). No presente estudo, a administração foi iniciada no primeiro dia de gestação, o que poderia explicar parcialmente a ausência de efeito da administração materna de VD sobre o peso da prole ao nascer.

Além de causar redução do peso e comprimento ao nascer, a exposição pré-natal a DEX alterou o desenvolvimento físico e neural da prole. Nossos dados mostraram que o dia de abertura dos olhos foi adiantado nos animais expostos a DEX no período pré-natal. A exposição a DEX no 4º dia após o nascimento também promoveu adiantamento da abertura dos olhos (Gramsbergen e Mulder, 1998; Benesová *et al.*, 1999), processo que parece sofrer influências complexas de fatores metabólicos após a administração de GC durante as fases de desenvolvimento (Uno *et al.*, 1990). Por outro lado, nossos resultados mostraram um atraso no tempo para execução do reflexo de geotaxia negativa e também para o reflexo de endireitamento. Estes atrasos podem estar relacionados com prejuízos no desenvolvimento do sistema vestibular e em primeira instância, com o funcionamento do cerebelo, uma vez que a execução destes reflexos necessita de padrões

complexos de contração muscular, que estão sob controle da função cerebelar (Gramsbergen e Mulder, 1998). Outros estudos são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos nas alterações desenvolvimentais induzidas pela DEX pré-natal. A literatura é escassa no que diz respeito à administração gestacional com VD e o desenvolvimento da prole e o presente trabalho mostrou pela primeira que a administração gestacional com VD parece não ter efeitos no desenvolvimento físico e neural da prole exposta à programação fetal induzida pela DEX.

De acordo com a literatura, o peso de animais expostos a DEX no período pré-natal se comporta de maneira transiente e sexo-dependente ao longo da vida. Chou e colaboradores (2017) demonstraram que na primeira semana pós-natal, o peso de ratos machos que foram expostos a DEX é reduzido, contudo o padrão de peso muda conforme os animais vão envelhecendo. Aos 120 dias, por exemplo, o peso dos animais já é comparável entre os grupos, enquanto aos 180 dias os animais DEX apresentam maior peso corporal. Isso demonstra possíveis efeitos obesogênicos da exposição pré-natal aos GC. Por outro lado, Hsu e colaboradores (2018) demonstraram que machos expostos a DEX no período gestacional, não apresentam diferença no peso corporal aos 120 dias de vida, contudo fêmeas apresentam menor peso quando comparadas ao seu respectivo grupo controle.

Nossos dados mostram que a exposição pré-natal a DEX promove um padrão diferente de mudanças no peso corporal durante a vida adulta entre machos e fêmeas. Enquanto machos expostos a DEX pré-natal foram mais leves que os animais do grupo CTL durante todo período experimental, fêmeas tiveram um peso similar ao grupo CTL após 6 meses de idade, até o fim dos experimentos. A redução no peso dos compartimentos de gordura omental e perigonadal, podem explicar, pelo menos em parte, a redução de peso nos machos expostos a DEX no período pré-natal. Embora alguns estudos mostrem que ocorre uma recuperação no peso de machos e fêmeas exposto à DEX pré-natal (Tsai et al. 2019), nós observamos essa recuperação apenas em fêmeas após o 6º mês pós-natal. A redução de peso nas proles, tanto em machos quanto em fêmeas é corroborada por outros estudos que submeteram roedores gestantes a altas concentrações de GC, como estresse de restrição, restrição alimentar ou administração pré-natal de DEX. (Valtat et al., 2011; Liu et al. 2012; Slotkin et al. 2013).

Ainda sobre as alterações no peso corporal, os resultados do presente estudo mostraram que a administração materna com VD não afeta o peso corporal de fêmeas, contudo pode estar relacionada a uma redução tardia desse parâmetro em machos expostos a DEX pré-natal. Além disso, a combinação de VD e DEX pré-natal, reduziu o conteúdo total de tecido adiposo, o que pode explicar parcialmente a redução no peso corporal em machos com 12 meses de idade. Embora não tenhamos avaliado a ingesta alimentar, Farhangi e colaboradores (2017), mostraram que a administração com VD reduz a ingesta alimentar, e que isso está relacionado com a redução de BDNF (*brain derived neurotropic fator*). O BDNF é reconhecido como um dos principais fatores envolvidos no controle da ingestão alimentar (Rosa-Vargas, 2011) e parece que a VD reduz a sua expressão e assim regula a ingestão alimentar (Pozzi, Frajese GV e Frajese G; Farhangi *et al.*, 2017). Adicionalmente, parece haver uma relação entre VD e as concentrações de leptina, uma vez que camundongos *knockout* para 1 $\alpha$ -hidroxilase apresentam menores concentrações de leptina e elevada ingesta alimentar quando comparados a linhagem selvagem. (Narvaez et al. 2009).

## **5.2. Parâmetros metabólicos**

Consistente com estudos anteriores, a administração de DEX no terço final da gestação não induz intolerância a glicose na prole até 6 meses de idade, independentemente do sexo (Drake et al. 2010; Payolla et al. 2019). No entanto, quando avaliamos, no presente estudo, os efeitos a longo prazo da programação fetal induzida pela DEX, aos 12 meses de idade, machos e fêmeas desenvolveram intolerância a glicose. Este dado sugere que o desenvolvimento da intolerância a glicose no contexto da exposição pré-natal a DEX pode estar associado a fatores relacionados ao processo de envelhecimento. De fato, a exposição ao estresse durante a gestação induz intolerância a glicose em machos idosos, com 24 meses (Lesage et al. 2004). Ainda, a administração de DEX em roedores jovens induz intolerância a glicose em machos com 3 e 12 meses, enquanto em fêmeas essa alteração é vista apenas com 12 meses de idade (dos Santos et al. 2014).

Ainda, nossos dados mostram que a administração gestacional com VD não promoveu efeito significativo sobre a tolerância a glicose, bem como não teve efeito protetor contra a intolerância a glicose desenvolvida nos animais expostos a DEX no período pré-natal. Com relação aos efeitos da VD sobre a tolerância a glicose, alguns

estudos demonstram que não há efeitos sobre a glicemia e resistência à insulina em pacientes com diabetes tipo 2 (Witham et al. 2010), bem como em pacientes que não apresentam alterações na homeostase glicêmica de (Pittas et al. 2007; Boer et al. 2008). Por outro lado, estudos randomizados mostraram que a administração com VD melhorou a função de células beta pancreáticas (Mitri et al. 2011) e o controle glicêmico em pacientes com diabetes tipo 2 (Strobel et al. 2014). Desse modo, os efeitos benéficos da administração com VD sobre a homeostase glicêmica ainda precisa de maiores investigações.

No presente estudo, a administração pré-natal de DEX causou diminuição na sensibilidade à insulina e aumento no conteúdo de triglicerídeo hepático seletivamente em machos. Resistência à insulina tem sido previamente evidenciada em machos com 40 dias de idade, nascidos de mães submetidas ao tratamento com DEX durante a gestação (Buhl et al. 2007). Parte dos mecanismos responsáveis pela ocorrência disso, é o aumento na atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e resistência hepática à insulina após exposição fetal a DEX. Estes fatos podem estar associados ou com a redução na supressão da expressão de PEPCCK hepática, mediada pela insulina (Buhl et al. 2007), que acarreta no aumento na síntese hepática de glicose via gliconeogênese, ou à diminuição na captação muscular de glicose mediada pela insulina (Buhl et al. 2010).

O aumento na quantidade de lipídios hepáticos está relacionado com a própria resistência à insulina (para revisão ver Perry et al. 2010). Brevemente, o aumento no conteúdo de diacilglicerol hepático causa ativação da proteína cinase C $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ), resultando em inibição da via de sinalização mediada pela insulina. Consequentemente, há redução na síntese de glicogênio e aumento na síntese de glicose via gliconeogênese. Alternativamente, pode-se supor que a resistência à insulina mostrada no nosso estudo pode estar associada com um perfil inflamatório. De fato, a exposição pré-natal à DEX aumenta a expressão gênica, no tecido adiposo, de marcadores inflamatórios e aumenta as concentrações plasmáticas de interleucina 6 (IL6), IL1 $\beta$ , fator de necrose tumoral alfa, bem como a concentração de ácidos graxos livres no plasma, em machos e fêmeas aos 6 meses de idade (Wyrwoll et al. 2008; Mark et al. 2014). A elevação de citocinas pró-inflamatórias está associada com aumento na lipólise e consequente aumento nas concentrações de ácidos graxos livres (Evans e Williamson, 1991; Wyrwoll et al. 2008). Esses dados sugerem que o aumento na concentração plasmática de ácidos graxos livres,

encontrado em ratos machos expostos no período pré-natal a DEX, pode estar, pelo menos em parte, contribuindo para o aumento no conteúdo hepático de triglicerídeos e consequente resistência à insulina vista em nosso trabalho

Os presentes dados mostraram que a administração gestacional com VD, foi capaz de melhorar a sensibilidade à insulina e reduzir o acúmulo de triglicerídeos hepáticos em machos expostos a DEX durante o período pré-natal. Embora não tenhamos mensurado a concentração plasmática de VD nos animais experimentais, a concentração de cálcio plasmático foi aumentada em machos e fêmeas nascidos de mães que receberam VD, o que pode estar indiretamente associado com elevações na concentração plasmática de VD. A administração de calcitriol, a forma biologicamente ativa da VD, resulta em supressão na expressão de genes relacionados a lipogênese hepática, redução de marcadores pró-inflamatórios, bem como está associada a redução no acúmulo de lipídios hepáticos em camundongos. (Kong et al. 2014; Li et al. 2017). Além disso, a administração de VD está relacionada, *in vitro* e *in vivo*, com a redução na expressão de marcadores inflamatórios no tecido adiposo, (Gonzalez-Molero et al. 2013; Landrier et al. 2016) e promove infra-regulação na expressão e produção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 (Giulietti et al. 2007; Neve et al. 2013). Os efeitos protetores da administração gestacional com VD aqui encontrados, atenuando a resistência a insulina, podem estar relacionados a uma redução no acúmulo de triglicerídeos hepáticos e redução no perfil inflamatório. com

Os mecanismos subjacentes a essas alterações metabólicas ainda permanecem incertos. Já se sabe que a exposição pré-natal a DEX pode causar redução na expressão de *pancreatic and duodenal homeobox factor-1* (PDX-1), um fator de transcrição essencial para o desenvolvimento e função das células  $\beta$  (Chen et al. 2017). Além disso, o *neuronal differentiation 1* (Neuro d1) e o *paired box gene 6* (PAX-6), dois importantes reguladores do desenvolvimento das células  $\beta$  pancreáticas, são modificados pela exposição pré-natal a DEX (Chen et al. 2017).

Altas concentrações de GC durante o terço final da gestação promovem consequências para o crescimento do feto e, particularmente para o desenvolvimento do pâncreas endócrino. O padrão de alterações no desenvolvimento do pâncreas durante exposição aos GC parece mudar de acordo com a idade. Dumortier e colaboradores (2011), mostraram que a administração de DEX no terço final da gestação promove

redução na massa de células  $\beta$  no feto no último dia de gestação. No mesmo sentido, a administração de dexametasona no terço final da gestação promove redução na massa de célula beta pancreáticas no terceiro dia pós-natal (Santos-Silva *et al.* 2020) Outro estudo mostrou redução na porcentagem de ilhotas pancreáticas e diminuição no conteúdo pancreático de insulina em machos com 7 dias de idade (Somm *et al.* 2012). Ainda, quando a análise é feita durante a vida adulta, aos 120 dias, a administração pré-natal de DEX também promove redução na massa de células  $\beta$  pancreáticas em ratos machos (Chen *et al.* 2017). Contudo, nossos dados demonstraram um aumento na massa de células  $\beta$  nos ratos nascidos de mães expostas a DEX no terço final da gestação, quando analisados aos 6 e 12 meses de idade. Portanto, confirmam a ideia de que o padrão de alterações no desenvolvimento do pâncreas exposto à DEX depende da idade em que este é avaliado.

O aumento na massa de células  $\beta$  pode estar relacionado com aumento na insulinemia, uma vez que a glicemia de jejum foi similar entre os grupos experimentais, inclusive aqueles que apresentaram resistência à insulina. Altas doses de DEX em ratos adultos promove resistência à insulina e aumento na massa de células  $\beta$ , e os autores sugerem um papel mitogênico para a insulina por promover proliferação de células  $\beta$  *in vivo* e participar na via de sinalização mediada pela PI3 cinase e PDX-1, uma vez que essas proteína estão aumentadas em animais submetidos ao tratamento com DEX (Rafacho *et al.* 2009).

Nossos dados mostraram um efeito protetor da VD sobre a resistência à insulina e expansão de células  $\beta$  induzidos pela exposição pré-natal a DEX em machos. Os mecanismos envolvidos nessa proteção permanecem incertos. Contudo, gestantes submetidas à uma dieta desprovida de VD apresentam comprometimento no desenvolvimento do pâncreas endócrino de camundongos, causando alterações estruturais e conseqüentemente, alteração na via de sinalização mediada pela insulina (Maia-Ceciliano *et al.* 2016). Essas alterações encontradas foram relacionadas com redução nos níveis de insulina, PDX-1 substrato para o receptor de insulina do tipo 1, fofatidilinositol 3 cinase, transportador de glicose do tipo 2 e glicocinase, bem como redução na massa de células  $\beta$  em machos com 3 meses de idade (Maia-Ceciliano *et al.* 2016). Nossos dados mostram que o aumento no conteúdo de triglicérides hepático podem estar relacionados com a resistência à insulina e, conseqüentemente a expansão na massa de células  $\beta$ . Ainda, nesse contexto, foi interessante notar que a administração

maternal com VD teve um efeito protetor, pois foi capaz de prevenir essas alterações metabólicas induzidas pela DEX pré-natal em machos com 6 e 12 meses pós-natal.

Vários estudos associam o status de VD e a homeostase glicêmica. A secreção de insulina é prejudicada em modelos animais de deficiência de VD, que está relacionada a redução intracelular de cálcio (Norman et al. 1980). Além disso, variações alélicas nos genes que codificam o VDR estão relacionadas com intolerância a glicose e diminuição na secreção de insulina (Palomer et al. 2008), confirmando um papel direto da VD na homeostase glicêmica. Estudos *in vitro* também mostram que a VD aumenta a expressão gênica do transportador de glicose do tipo 4 e aumenta a utilização de glicose (Manna e Jain, 2012). O presente trabalho mostrou que a administração gestacional com VD não teve influência sobre a tolerância a glicose e nem protegeu os animais contra a intolerância a glicose induzida pela DEX pré-natal. Contudo, a administração materna com VD foi capaz de atenuar a resistência à insulina em machos.

Em uma perspectiva metabólica, nós evidenciamos nesse trabalho, que machos são mais suscetíveis que fêmeas aos danos causados pela DEX pré-natal, especificamente considerando a redução na sensibilidade a insulina e aumento do conteúdo de lipídios hepáticos. A proteção contra a programação fetal induzida pela DEX em fêmeas geralmente está relacionada aos efeitos dos esteroides sexuais femininos. De fato, o estrógeno previne a resistência à insulina induzida por dieta obesogênica por aumentar o índice de utilização de glicose mediada pela insulina no tecido adiposo subcutâneo e ovariano, tecido adiposo marrom e musculo esquelético. (Riant et al. 2009). Do mesmo modo, o estradiol regula a despolarização e influxo de cálcio nas células  $\beta$  pancreáticas (Alonso-Magdalena et al., 2006), além de inibir o canal de potássio dependente de ATP nessas células (Nadal et al., 2009), o que pode levar ao aumento na secreção de insulina. Além disso, o estradiol promove proteção contra o acúmulo de lipídios hepáticos e esteatose hepática em camundongos submetidos a dieta obesogênica (Bryzgalova et al. 2008).

Sumarizando os resultados relacionados ao metabolismo, nosso estudo sugere que as alterações metabólicas induzidas pela administração de DEX no terço final da gestação em ratos são dependentes da idade e do sexo. Os resultados observados foram vistos mais tardiamente na vida adulta e as fêmeas foram mais resilientes a programação fetal que os machos. Nós também demonstramos, pela primeira vez, um efeito protetor da

administração gestacional com VD, atenuando a resistência à insulina e o acúmulo de lipídio hepático induzidos pela exposição pré-natal a DEX.

### 5.3. Parâmetros comportamentais

Referente aos resultados relacionados ao comportamento do tipo ansioso, nosso trabalho mostrou que tanto machos quanto fêmeas são suscetíveis ao efeito ansiolítico transitório da programação fetal induzida pela DEX. De modo geral, a exposição pré-natal à DEX promoveu redução no comportamento do tipo ansioso em machos e fêmeas estudados aos 3 meses de idade, avaliado pelo teste de LCE, mas não aos 6 e 12 meses. Ao contrário do que foi observado no 3º mês pós-natal, no 6º mês o tratamento pré-natal com DEX causou aumento no comportamento do tipo ansioso, avaliado através do teste de campo aberto, tanto em machos quanto em fêmeas. No entanto, quando os animais foram avaliados no 12º mês pós-natal, o comportamento do tipo ansioso desaparece, porém os resultados o LCE e do CA mostram que, em fêmeas, a exposição pré-natal à DEX impede o efeito ansiolítico causado pela administração gestacional com VD.

O efeito ansiolítico da programação fetal induzido pela DEX no LCE é corroborado por dados de Velisek (2006) que mostrou um efeito ansiolítico da exposição pré-natal a betametasona em machos e fêmeas avaliados no 20º dia pós-natal, sugerindo que esse efeito pode ser devido em parte ao aumento na expressão hipocampal do neuropeptídeo Y, um potente fator ansiolítico (Heilig, 2004). Além disso, a exposição pré-natal ao estresse de restrição durante o terço médio e terço final da gestação, promoveu redução do comportamento do tipo ansioso em fêmeas estudadas aos 3 meses de idade, enquanto machos tiveram resposta oposta (Zuena *et al.*, 2008). Contudo, esses efeitos parecem ser transitórios, dado que o efeito ansiolítico da exposição pré-natal a DEX desaparece nos animais avaliados aos 6 e 12 meses de idade.

Nossos dados mostraram que, ao contrário do que foi visto aos 3 meses de idade, machos e fêmeas expostos a DEX no período pré-natal e avaliados no 6º mês pós-natal tiveram aumento do comportamento do tipo ansioso, visto pelos resultados do teste de campo aberto. É importante ressaltar que as medidas para ansiedade registradas em diferentes testes para ansiedade, se distribuem em diferentes fatores, demonstrando assim que os diferentes testes avaliam diferentes tipos de ansiedade. Sendo assim, os dados que

se mostraram contrários no presente trabalho, podem ser devido a diferença intrínseca de cada teste (File e Pellow, 1985; Belzung e Le Pape, 1994).

Interessantemente, a administração gestacional com VD foi capaz de atenuar esse comportamento tanto em machos quanto em fêmeas, mostrando-se como um possível agente neuro protetor. Já tem sido demonstrado que a administração de DEX durante o terço final da gestação promove aumento do comportamento do tipo ansioso em machos avaliados na décima semana pós-natal (Nagano, Ozawa e Suzuki, 2008). Esse efeito também foi observado no teste de campo aberto em machos avaliados no sexto mês pós-natal e parece estar associado com o aumento na expressão de mRNA para CRH na amígdala (Welberg, Seckl e Holmes, 2001). Ainda, outro estudo demonstrou que em machos, mas não em fêmeas, no sexto mês de idade, há redução na porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, indicando maior susceptibilidade dos machos aos efeitos ansiogênicos da exposição pré-natal a DEX (Hossain *et al.*, 2008). Além dos estudos experimentais, evidências clínicas também sugerem que a exposição pré-natal a glicocorticoides ou estresse modificam os padrões comportamentais da prole causando ansiedade. (Weinstock, 2008; Kinsella e Monk, 2009).

Além da participação do eixo HHA, alguns estudos sugerem que a exposição pré-natal aos GC ou estresse também alteram o sistema glutamatérgico. O estresse pré-natal promove aumento na concentração hipocampal de glutamato, bem como aumento na expressão dos níveis proteicos do receptor NMDA, transportadores de aminoácidos excitatórios e aumento na liberação de glutamato no hipocampo e córtex pré-frontal (Jia *et al.*, 2009; Guan *et al.*, 2013). Além disso, Cao e colaboradores (2018) mostraram que o estresse pré-natal leva a um aumento no comportamento do tipo ansioso, visto pelo teste de campo aberto, e está associado com o aumento na expressão de monômeros responsáveis pela formação do complexo SNARE, responsável pelo ancoramento e exocitose das vesículas de glutamato, no hipocampo e no córtex pré-frontal de machos e fêmeas com 60 dias de idade.

Outro possível alvo para os efeitos da programação fetal induzida pela DEX, é o sistema serotoninérgico. A administração de DEX no terço final da gestação causa aumento no comportamento do tipo ansioso e depressivo seletivamente em fêmeas avaliadas no 60º dia pós-natal, e essas alterações estão associados com redução na expressão de

triptofano hidroxilase (TPH), enzima essencial e limitante no processo de síntese da serotonina no núcleo dorsal da rafe (Hiroi et al., 2016). Consistente com Hiroi e colaboradores (2016), um estudo realizado em nosso laboratório (Gregorio et al., 2020-dados não publicados), mostra que a exposição pré-natal a DEX causa diminuição na expressão de TPH e 5HT<sub>1A</sub>, um receptor inibitório no metabolismo serotoninérgico, no núcleo dorsal da rafe em fêmeas avaliadas no 6º mês pós-natal. Além disso, a exposição a DEX no terço final da gestação promove aumento na porcentagem de ligação da serotonina com o receptor 5HT<sub>1A</sub> e aumento na porcentagem de ligação de serotonina ao seu transportador, no córtex de machos avaliados aos 60 dias de idade (Slotkin et al., 2006).

Nagano e colaboradores (2012) também evidenciaram que a exposição pré-natal a DEX promove redução de mRNA para o receptor 5HT<sub>1A</sub> no córtex pré-frontal de machos avaliados na 4ª e 10ª semana pós-natal, bem como redução na concentração de BDNF na 4ª semana pós-natal. Esses dados foram associados com aumento no comportamento do tipo ansioso avaliado pelo teste de campo aberto e pelo teste da caixa claro/escuro. A ativação dos receptores 5HT<sub>1A</sub> está associada com a inibição do comportamento do tipo ansioso (Wang et al., 2009) e alguns estudos sugerem que esse receptor no hipocampo possui importantes funções no alívio de sintomas depressivos relacionados ao estresse traumático (Sarnyai et al., 2000; Burke et al., 2013). Desse modo, o comportamento do tipo ansioso induzido pela DEX pré-natal, visto em nosso trabalho, pode estar relacionado, pelo menos em partes, com alterações no sistema serotoninérgico e/ou glutamatérgico, dado as evidências encontradas na literatura.

Ainda com relação aos parâmetros envolvidos no comportamento do tipo ansioso, nosso trabalho mostrou que a administração gestacional com VD atenuou o comportamento do tipo ansioso induzido pela DEX em machos e fêmeas avaliados aos 6 meses de idade. Há poucos trabalhos que associam o status de VD materna com ansiedade da prole da vida adulta. Recentemente demonstrou-se que a administração de VD no 15º dia da gestação, período crítico para o desenvolvimento do sistema límbico, não produz alterações no comportamento do tipo ansioso na prole adulta (Vuillermot., 2017).

Por outro lado, um estudo demonstrou que uma dieta enriquecida com VD promove redução do comportamento do tipo ansioso quando comparado a um grupo que estava recebendo dieta deficiente em VD (Pan et al., 2012). Além disso, os mesmos

autores mostraram que a elevação na quantidade de VD consumida pelas mães está associada com o aumento de cálcio e VD plasmáticos na prole. No nosso trabalho não foi possível fazer a dosagem de VD na prole, contudo houve um aumento na concentração de cálcio plasmático nos grupos que nasceram de mães administradas com VD, mostrando que, talvez, os efeitos neuro protetores da VD sejam causados por um aumento de VD plasmática na prole.

Nesse sentido, a literatura mostra possíveis influências da VD na modulação do sistema serotoninérgico. Um estudo recente identificou a presença de elementos responsivos a VD (VDREs) no gene que codifica a expressão de TPH<sub>2</sub>, sendo que a ligação da VD promove a ativação na expressão desse gene (Patrick e Ames, 2014). Além disso, a administração crônica de calcitriol, promove aumento na quantidade relativa de VDR, nos níveis de mRNA para TPH<sub>2</sub> bem como aumento na concentração de diversos neurotransmissores como glutamato, GABA e glicina no córtex pré-frontal de ratos (Jiang et al. 2014). Um estudo *in vitro* demonstrou que o calcitriol induz o aumento na expressão de TPH<sub>2</sub> em células da rafe em ratos (Kaneko et al., 2015). Ainda no que diz respeito ao envolvimento da VD no sistema serotoninérgico, um estudo recente mostrou, *in vitro*, que o calcitriol promove redução nos níveis de mRNA para o transportador de recaptação de serotonina (SERT) bem como diminuição de mRNA para MAO-A, enzima predominante no catabolismo da serotonina (Marya et al., 2018).

Sendo assim, a VD não só induz a síntese de serotonina, mas também participa da manutenção dos níveis extracelulares de serotonina por diminuir SERT e MAO-A. Dados que podem explicar, pelo menos em parte, o efeito neuro protetor da VD no contexto do comportamento do tipo ansioso induzido pela programação fetal pela DEX visto em nosso trabalho.

No que tange a memória de trabalho avaliada pelo teste de reconhecimento de objetos, nosso trabalho mostrou que apenas machos foram sensíveis às alterações provocadas pela programação fetal pela DEX ou pela administração gestacional com VD. Quando avaliados no 3º mês pós-natal, o tratamento pré-natal com DEX promoveu melhora na memória de longo prazo, representada pelo aumento do IR. Além disso, quando provenientes de mães que receberam concomitantemente a administração gestacional com VD e o tratamento com DEX, esse parâmetro foi normalizado. Esse efeito apresenta transitoriedade, já que não houve melhora na cognição induzida pela

exposição a DEX pré-natal no 6º e 12º mês pós-natal. Contudo, aos 12 meses foi a administração gestacional com VD que promoveu melhora na memória de curto prazo em machos. Entretanto, esse efeito foi suprimido pela exposição pré-natal à DEX.

Memória de trabalho se refere a capacidade de armazenar informações para executar ações por um curto período de tempo e pode ser dividida em três componentes principais: o centro executivo e dois subsistemas especializados no processamento e manipulação de informações, o sistema verbal e o espaço-visual (para revisão ver: Baddeley, 1992). Em humanos, baixas doses de DEX administrada no primeiro trimestre da gestação, resultam em prejuízo na memória de curto prazo, mas sem alterações na memória de longo prazo (Hirvikoski *et al.*, 2007). Ainda, Wallensteen e colaboradores (2016) demonstraram que meninas são mais suscetíveis que meninos, às ações da DEX administrada no primeiro trimestre da gestação quando a memória de trabalho foi avaliada. Essa diferença pode ser atribuída à maior densidade de GR encontrada no cérebro feminino quando comparada ao masculino (Hill, Laird e Robinson, 2014).

Contudo nossos dados mostraram maior susceptibilidade de machos aos efeitos da DEX pré-natal, e essa diferença pode estar relacionada com a dose de DEX e ao período de administração. Nos trabalhos citados acima, a dose de DEX foi mais baixa do que a utilizada no presente estudo, seguindo as recomendações para o tratamento de hiperplasia adrenal congênita. Ainda, a administração foi realizada no primeiro trimestre da gestação, enquanto no nosso trabalho a dose de DEX foi maior e a administração foi feita no último trimestre de gestação.

O período em que a prole é avaliada também deve ser levado em consideração. A administração de DEX no terço final da gestação não altera, por exemplo, a memória de trabalho de machos e fêmeas avaliados precocemente na 9º semana após o parto (Levin *et al.*, 2014). Além disso, já foi demonstrado que machos expostos à DEX no período pré-natal apresentam alteração na morfologia hipocampal e redução na expressão de mRNA para GAD1 (do inglês *glutamic acid decarboxylase* no hipocampo aos 120 dias de vida (Lui *et al.*, 2015). Sabe-se que alterações na transmissão glutamatérgica podem contribuir para alterações comportamentais e cognitivas (Guidotti *et al.*, 2005), levando a alterações no que diz respeito a memória de trabalho. Uma possível alteração na neurotransmissão mediada pelo glutamato, pode estar associada com os efeitos causados pela DEX pré-natal em nosso estudo.

A VD possui ações intócrinas no sistema nervoso central (Eyles *et al.*, 2003) além de terem sido reportadas ações neuro protetoras e antioxidantes em neurônios de humanos (Kalueff e Tuohimaa, 2007; Liu e Hewison, 2012) e de roedores (O'Loan *et al.*, 2007). No contexto gestacional, a deficiência de VD em humanos não altera as funções cognitivas da prole durante a infância e adolescência (Veena *et al.*, 2017). Em animais a administração de VD não altera comportamentos relacionados a ansiedade, interação social e memória de ratos avaliados no 49º dia pós-natal (Vuillermot *et al.*, 2017).

A reversão, pela VD, na melhora induzida pela exposição pré-natal à DEX, na memória de machos com 3 meses pode estar relacionada às ações da DEX e da VD na barreira hemato-encefálica (BHE). Em camundongos, a administração de DEX durante a gestação promove redução na integridade da BHE na prole masculina de camundongos (Frahm e Tobet, 2015), enquanto a deficiência de VD aumenta os danos à integridade da BHE depois de um quadro de isquemia cerebral (Sayeed *et al.*, 2019).

A integridade da BHE depende do controle intacto do metabolismo da glicose (Muneer *et al.* 2011) que requer, entre outros fatores, a presença do transportador de glicose GLUT1 na BHE. A VD promove aumento na expressão de GLUT1 e por isso efeitos antidiabéticos têm sido atribuídos a ela, (Tamilselvan *et al.* 2013). No presente trabalho demonstramos que machos expostos a DEX no período pré-natal apresentam menor sensibilidade a insulina e esse quadro é prevenido quando houve a administração gestacional com VD. Isso suporta a ideia de que o status de VD possa ter contribuído para a reversão comportamental induzida pela exposição pré-natal à DEX em machos, podendo estar envolvida com a regulação do metabolismo da glicose na BHE, especificamente, com a regulação do GLUT1.

Em uma perspectiva comportamental, podemos concluir que a administração pré-natal com DEX promove efeitos deletérios, principalmente no que diz respeito ao comportamento do tipo ansioso em machos e fêmeas. Além disso, a administração gestacional com VD possui um efeito neuro protetor, não apenas por ser capaz de impedir as ações causadas pela DEX, mas também por promover redução no comportamento do tipo ansioso seletivamente em fêmeas com 12 meses de idade e também melhorar a retenção de memória de curto prazo seletivamente em machos com 12 meses.

## 6. CONCLUSÃO

Sendo assim, nossos dados sugerem que as alterações metabólicas e comportamentais induzidas pela administração pré-natal de DEX em ratos é dependente da idade e do sexo dos animais. No contexto metabólico os efeitos epigenéticos da DEX ocorrem mais tardiamente na vida adulta e fêmeas são mais resilientes a estes efeitos. Além disso, evidenciamos pela primeira vez, um papel protetor da administração gestacional com VD sobre a homeostase glicêmica, em machos expostos à DEX pré-natal. No contexto comportamental, machos e fêmeas parecem ser igualmente suscetíveis tanto aos efeitos da DEX pré-natal quanto ao efeito neuro protetor da VD pré-natal. Os mecanismos moleculares subjacentes a essa ação protetora da VD ainda precisam de mais investigações. A elucidação desses mecanismos contribuirá para o uso da VD durante a gestação como uma ferramenta terapêutica potencial para tratar mulheres que necessitam da terapia com GC durante a gestação.

## 7. REFERÊNCIAS

ABDUL-MUNEER, P.M., et al. Ethanol impairs glucose uptake by human astrocytes and neurons: protective effects of acetyl-L-carnitine. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol**, v. 3, p. 48-56, 2011.

ALONSO-MAGDALENA, P., et al. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. **Environ Health Perspect**, v. 114, p. 106-12, 2006.

ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cogn Process**, v. 13, n. 2, p. 93–110, 2012.

BADDELEY, A. Working memory. **Science**, v. 255, p. 556-9, 1992.

BAKER, A.M.; *et al.* A nested case-control study of midgestation vitamin D deficiency and risk of severe preeclampsia. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 11, p. 5105-5109, novembro, 2010.

BANASR, M.; DWYER, J.M.; DUMAN, R.S. (2011) Cell atrophy and loss in depression: reversal by antidepressant treatment. **Curr Opin Cell Biol**, v. 23, p. 730–737. 2011.

BANDELOW, B., *et al.* Biological markers for anxiety disorders, OCD and PTSD: A consensus statement. Part II. Neurochemistry, neurophysiology and neurocognition. **World J Biol Psychiatry**, v.15, n. 1, p. 1-53, fevereiro, 2016.

BARELLA, L. F.; De OLIVEIRA, J. C.; MATHIAS, P. C. Pancreatic islets and their roles in metabolic programming. **Nutrition**, v. 30, p. 373–379, 2014.

BATTISTON, F.G., et al. Glucose homeostasis in rats treated with 4-vinylcyclohexene diepoxide is not worsened by dexamethasone treatment. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.165, p.170-181, 2017.

BELZUNG, C., LE PAPE, G. Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. **Physiol Behav**, v.56, p.623-8, 1994.

BENESOVÁ, O., et al. Neuro-immuno-teratogenicity of drugs used in neonatal pharmacotherapy in relation to the ontogenic stage at the time of their administration. **Gen Physiol Biophys**, v.18, p.21-7, 1999.

BI, W.G., et al. Association Between Vitamin D Supplementation During Pregnancy and Offspring Growth, Morbidity, and Mortality: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA Pediatr**, v.172, p.635-645, 2018.

BOTTON, P. H. *et al.* Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. **Behav Brain Res**, v. 214, p. 254–259, 2010.

BOUILLON, R. *et al.* Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocr Rev**, v. 29, n. 6, p. 727-776, 2008.

BOUILLON, R. Vitamin D: from photosynthesis, metabolism, and action to clinical applications, endocrinology: adult and pediatric: vitamin D. **Elsevier**, 7<sup>a</sup> ed., p. 1018-1037, 2015.

BRAUN, T. *et al.* Early life glucocorticoid exposure: the hypothalamic pituitary adrenal axis, placental function and long term disease risk. **Endocr. Rev**, v. 34, p. 885–916, 2013.

BRINGHURST, R.; DEMAY, M.B.; KRONENBERG, H.M. Williams textbook of endocrinology: hormones and disorders of mineral metabolism. **Elsevier**, 12<sup>a</sup> ed., p. 1237- 1305, 2011.

BRUSCHETTINI, M. *et al.* Lowering the dose of antenatal steroids: the effects of a single course of bethamethasone on somatic growth and brain cell proliferation in the rat. **Am J Obstet Gynecol**, v. 194, p. 1341–1346, 2006.

BRYZGALOVA, G., et al. Mechanisms of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, E904-12, 2008.

BUHL, E. S., *et al.* Treatment with an SSRI antidepressant restores hippocampohypothalamic corticosteroid feedback and reverses insulin resistance in low-birth-weight rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**. v.298, n.5, p. 920-929, 2010.

BURKE, T.F., et al. Sensitivity of hippocampal 5-HT<sub>1A</sub> receptors to mild stress in BDNF-deficient mice. **Int J Neuropsychopharmacol**, v.16, p. 631-45, 2013.

CAO, Y.J., et al. Involvement of SNARE complex in the hippocampus and prefrontal cortex of offspring with depression induced by prenatal stress. **J Affect Disord**, v.235, p.374-383, 2018.

CAROBREZ, A. P. e BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. 29: 1193-1205, 2005.

CASS, W.A. *et al.* Evoked dopamine overflow is augmented in the striatum of calcitriol treated rats. **Neurochem Int**, v. 60, n. 2, p. 186-191, janeiro, 2012.

CHAPMAN, K.; HOLMES, M.; SECKL, J.  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action. **Physiol. Rev**, v. 93, p. 1139–1206, 2013.

CHEN, Y.C. *et al.* Pré-natal Dexamethasone Exposure Programs the Development of the Pancreas and the Secretion of Insulin in Rats. **Pediatrics and Neonatology**. v.16, p. 1-10, 2016.

CHEN, Y.C., *et al.* (2017). Pré-natal Dexamethasone Exposure Programs the Development of the Pancreas and the Secretion of Insulin in Rats. **Pediatrics & Neonatology**. v.58, n.2, p.135-144, 2017.

CHOU, M.Y., *et al.* Age-Dependent Effects of Prenatal Dexamethasone Exposure on Immune Responses in Male Rats. **Tohoku J Exp Med**, v.24, p.225-237, 2017.

CHRUVATTIL, R., *et al.* Dexamethasone Alters the Appetite Regulation via Induction of Hypothalamic Insulin Resistance in Rat Brain. **Mol Neurobiol**, v.54, p.7483-7496, 2017.

COMPSTON, J. Management of glucocorticoid-induced osteoporosis. **Nat Rev Rheumatol**, v. 6, p. 82–88, 2010.

COOLENS, J.L.; Van BAELEN, H.; HEYNS, W. Clinical use of unbound plasma cortisol as calculated from total cortisol and corticosteroidbinding globulin. **J Steroid Biochem**, v. 26, p. 197–202, 1987.

COUTINHO, A.E.; CHAPMAN, K.E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. **Mol Cell Endocrinol**, v. 335, p. 2–13, 2011.

DALZIEL, S.R. *et al.* Cardiovascular risk factors after antenatal exposure to betamethasone: 30-year follow-up of a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 365, p. 1856–1862, 2005.

DAWODU, A.; WAGNER, C.L. Mother-child vitamin D deficiency: an international perspective. **Arch Dis Child**, v. 92, n. 9, p. 737-740, setembro, 2007.

de BOER, I.H., *et al.* Women's Health Initiative Investigators. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of incident diabetes in the Women's Health Initiative. **Diabetes Care**, v.31, p.701-7, 2008.

DEAN, B.; COPOLOV, D.; SCARR, E. Understanding the pathophysiology of schizophrenia: Contributions from the Melbourne Psychiatric Brain Bank. **Schizophr Res**, v.177, n.1-3, p. 108-114, novembro, 2016.

Di DALMAZI, G. *et al.* Glucocorticoids and type 2 diabetes: from physiology to pathology. **Nutr. Metab**, v. 2012, 2012.

Di ROSA, M. *et al.* Immuno-modulatory effects of vitamin D3 in human monocyte and macrophages. **Cell Immunol**, v. 280, p. 36-43, 2012.

DIAZ, R.; BROWN, R.W.; SECKL, J.R. Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions. **J. Neurosci**, v. 18, n.7, p. 2570–2580, 1998.

DOS SANTOS, C., *et al.* Age- and gender-related changes in glucose homeostasis in glucocorticoid-treated rats. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 92, p. 867-78, 2014.

DRAKE, A. J., *et al.* Pré-natal Dexamethasone Programs Expression of Genes in Liver and Adipose Tissue and Increased Hepatic Lipid Accumulation But Not Obesity on a High-Fat Diet. **Endocrinology**. V.151, n.4, p.1581-1587, 2010.

DRAKE, A.J., *et al.* Prenatal dexamethasone programs expression of genes in liver and adipose tissue and increased hepatic lipid accumulation but not obesity on a high-fat diet. **Endocrinology**, v.151, p.1581-7, 2010.

DUMORTIER, O., *et al.* Impairment of rat fetal beta-cell development by maternal exposure to dexamethasone during different time-windows. **PLoS One**, v. 6, e25576, 2011.

EYLES, D.W. *et al.* Intracellular distribution of the vitamin D receptor in the brain: comparison with classic target tissues and redistribution with development. **Neuroscience**, v. 268, p. 1-9, 2014.

EYLES, D.W., *et al.* Vitamin D3 and brain development. **Neuroscience**, v. 118, p. 641–653, 2003.

FARHANGI, M.A., *et al.* The effects of vitamin D administration on brain inflammatory markers in high fat diet induced obese rats. **BMC Neurosci**, v.18, p.81, 2017.

FAULKNER. J.L. *et al.* Vitamin D supplementation improves pathophysiology in a rat model of preeclampsia. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 310, p. R346 – R354, 2016.

FILE, S.E., PELLOW, S. The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. **Br J Pharmacol**, v.86, p.729-35, 1985.

FOWDEN, A. L.; Li, J.; FORHEAD, A. J. Glucocorticoids and the preparation for life after birth: are there long-term consequences of the life insurance? **Proc. Nutr. Soc**, v. 57, p. 113–122, 1998.

FRAHM, K.A., TOBET, S.A. Development of the blood-brain barrier within the paraventricular nucleus of the hypothalamus: influence of fetal glucocorticoid excess. **Brain Struct Funct**, v. 220, p. 2225-34, 2014.

FRANKO, K.L.; FORHEAD, A.J.; FOWDEN, A.L. Differential effects of pré-natal stress and glucocorticoid administration on postnatal growth and glucose metabolism in rats. **J. Endocrinol**, v. 204, p. 319–329, 2010.

GASKIN, S. *et al.* Object familiarization and novel-object preference in rats. **Behav Processes**, v. 83, n.1, p. 61-71, 2010.

GATFORD, K. L. *et al.* Repeated betamethasone treatment of pregnant sheep programs persistent reductions in circulating IGF-I and IGF-binding proteins in progeny. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**, v. 295, p. E170–E178, 2008.

GHAVAMZADEH, S., MOBASSERI, M., MAHDAVI, R. The Effect of Vitamin D Supplementation on Adiposity, Blood Glycated Hemoglobin, Serum Leptin and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Type 2 Diabetic Patients. **Int J Prev Med**, v.5, p.1091-8, 2014.

GIULIETTI, A., *et al.* Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) works as anti-inflammatory. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 77, p. 47-57, 2007.

GOMAA, A.M., EL-AZIZ, E.A. Vitamin D reduces high-fat diet induced weight gain and C-reactive protein, increases interleukin-10, and reduces CD86 and caspase-3. **Pathophysiology**, v.24, p.31-37, 2017.

GONZÁLEZ-MOLERO, I., *et al.* Hypovitaminosis D and incidence of obesity: a prospective study. **Eur J Clin Nutr**, v. 67, p. 680-2, 2013.

GRAMSBERGEN, A., MULDER, E.J. The influence of betamethasone and dexamethasone on motor development in young rats. **Pediatr Res**, v.44, p.105-10, 1998.

GUAN, L., *et al.* The involvement of ERK/CREB/Bcl-2 in depression-like behavior in prenatally stressed offspring rats. **Brain Res Bull**, v.99, p. 1-8, 2013.

GUIDOTTI, A., *et al.* GABAergic dysfunction in schizophrenia: new treatment strategies on the horizon. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 180, p. 191-205, 2005.

GUIDOTTI, G. *et al.* Glucocorticoid receptor and FKBP5 expression is altered following exposure to chronic stress: modulation by antidepressant treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, p. 616-627, 2013.

GUPTA, A. *et al.* Role of serotonin in seasonal affective disorder. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, n. 17, v.1, p. 49-55, janeiro, 2013.

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **J Comp Psychol**, v. 18, p. 385-403, 1934.

HARMS, L.R. *et al.* Vitamin D and the brain. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 25, n. 4, p. 657-669, agosto, 2011.

HARRIS, A.; SECKL, J. Glucocorticoids, pré-natal stress and the programming of disease. **Horm. Behav**, v. 59, p. 279–289, 2011.

HART, P.H. *et al.* Vitamin D in fetal development: findings from a birth cohort study. **Pediatrics**, v. 135, n.1, p. e167-173, janeiro, 2015.

HAUSER, J.; FELDON, J.; PRYCE, C. R. Direct and dam-mediated effects of pré-natal dexamethasone on emotionality, cognition and HPA axis in adult Wistar rats. **Horm. Behav**, v. 56, p. 364–375, 2009.

HEILIG, M. The NPY system in stress, anxiety and depression. **Neuropeptides**. v.38, p.213-224, 2004.

HIDALGO, A.A., *et al.* 2011Dexamethasone enhances 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 effects by increasing vitamin D receptor transcription. **Journal of Biological Chemistry**. v.286, p.36228-36237, 2011.

HILL, A.C., LAIRD, A.R., ROBINSON, J.L. Gender differences in working memory networks: a BrainMap meta-analysis. **Biol Psychol**, v.102, p. 18-29, 2014.

HIROI, R. Sex-dependent programming effects of prenatal glucocorticoid treatment on the developing serotonin system and stress-related behaviors in adulthood. **Neuroscience**, v. 320, p.43-56, 2016.

HIROI, R. *et al.* Sex-dependent programming effects of pré-natal glucocorticoid treatment on the developing serotonin system and stress-related behaviors in adulthood. **Neuroscience**, v. 21, n. 320, p. 43-56, 2016.

HIRVIKOSKI, T., *et al.* Cognitive functions in children at risk for congenital adrenal hyperplasia treated prenatally with dexamethasone. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, p. 542-548, 2007.

HOLICK, M.F. Vitamin D deficiency. **N Engl J Med**, v, 357, n. 3, p. 266–281, julho, 2007.

HOSSAIN, A., *et al.* Pré-natal dexamethasone impairs behavior and the activation of the BDNF exon IV promoter in the paraventricular nucleus in adult offspring. **Endocrinology**. v.149, n.12, p.6356-6365, 2008.

HOSSAIN, A., *et al.* Prenatal dexamethasone impairs behavior and the activation of the BDNF exon IV promoter in the paraventricular nucleus in adult offspring. **Endocrinology**, v. 149, p. 6356-65, 2008.

HOSSAIN, N. *et al.* Obstetric and neonatal outcomes of maternal vitamin D supplementation: results of an open-label, randomized controlled trial of antenatal vitamin D supplementation in Pakistani women. **J Clin Endocrinol Metab**, v.99, p. 2448–2455, 2014.

HOSSEIN-NEZHAD, A.; HOLICK, M.F. Vitamin d for health: a global perspective. **Mayo Clin Proc**, v.88, n. 7, p. 720-755, julho, 2013.

HSU, C.N., *et al.* Postnatal high-fat diet sex-specifically exacerbates prenatal dexamethasone-induced hypertension: Mass spectrometry-based quantitative proteomic approach. **J Nutr Biochem**, v.57, p.268-275, 2018.

HUNTER, R. G. *et al.* Acute stress and hippocampal histone H3 lysine 9 trimethylation, a retrotransposon silencing response. **Proc. Natl Acad. Sci**, v. 109, p. 17657–17662, 2012.

JIA, N. *et al.* Prenatal stress causes dendritic atrophy of pyramidal neurons in hippocampal CA3 region by glutamate in offspring rats. **Dev Neurobiol**, v.70, p. 114-25, 2010.

JIANG, P. *et al.* Dysregulation of vitamin D metabolism in the brain and myocardium of rats following prolonged exposure to dexamethasone. **Psychopharmacology**, v. 231, p. 3445–3451, 2014.

JIANG, P., *et al.* Neurochemical effects of chronic administration of calcitriol in rats. **Nutrients**, v.6, p.6048-59, 2014.

JOHAM A.E. *et al.* Vitamin D in polycystic ovary syndrome: Relationship to obesity and insulin resistance. **Mol Nutr Food Res**, v.60, n. 1, p. 110–118, 2010.

KADMIEL, M.; CIDLOWSKI, J.A. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. **Trends Pharmacol Sci**, v. 34, p. 518–530, 2013.

KALRA, P. *et al.* (2012) Effect of vitamin D supplementation during pregnancy on neonatal mineral homeostasis and anthropometry of the newborn and infant. **Br J Nutr**, v. 108, n. 6, p. 1052-1058, setembro, 2012.

KALUEFF, A.V., TUOHIMAA, P. Neurosteroid hormone vitamin D and its utility in clinical nutrition. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 10, p. 12-19, 2007.

KANEKO, I., *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D regulates expression of the tryptophan hydroxylase 2 and leptin genes: implication for behavioral influences of vitamin D. **FASEB J**, v.29, p. 4023-35, 2015.

KAPOOR, A.; PETROPOULOS, S.; MATTHEWS, S. G. Fetal programming of hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis function and behavior by synthetic glucocorticoids. **Brain Res. Rev**, v. 57, p. 586–595, 2008.

KINNEY, D.K. *et al.* Relation of schizophrenia prevalence to latitude, climate, fish consumption, infant mortality, and skin color: a role for pré-natal vitamin d deficiency and infections? **Schizophr Bull**, v.35, n. 3, p. 582-595, maio, 2009.

KINSELLA, M.T., MONK, C. Impact of maternal stress, depression and anxiety on fetal neurobehavioral development. **Clin Obstet Gynecol**, v.52, p.425-440. 2009.

KONG, M., *et al.* Vitamin D deficiency promotes nonalcoholic steatohepatitis through impaired enterohepatic circulation in animal model. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 307, p. 883-93, 2014.

LANDRIER, J.F., *et al.* Vitamin D modulates adipose tissue biology: possible consequences for obesity? **Proc Nutr Soc**, v.75, p.38-46, 2016.

LANDRIER, J.F., *et al.* Vitamin D modulates adipose tissue biology: possible consequences for obesity? **Proc Nutr Soc**, v. 75, p. 38-46, 2016.

LESAGE, J., *et al.* Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. **J Endocrinol**, v. 181, p. 291-6, 2004.

LEVIN, E.D., *et al.* Prenatal dexamethasone augments the neurobehavioral teratology of chlorpyrifos: significance for maternal stress and preterm labor. **Neurotoxicol Teratol**, v.41, p. 35-42, 2013.

LIN, K.T.; WANG, L.H. New dimension of glucocorticoids in cancer treatment. **Steroids**, v. 111, p. 84–88, 2016.

LINDSAY, R.S.; WADDELL, R.M.; SECKL JR, B.J. Pré-natal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 betahydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. **Diabetologia**, v.39, p. 1299– 1305, 1996.

- LIU, N.Q., HEWISON, M. Vitamin D, the placenta and pregnancy. **Arch Biochem Biophys**, v. 523, p. 37-47, 2012.
- LIU, W., et al. Swimming exercise ameliorates depression-like behaviors induced by prenatal exposure to glucocorticoids in rats. **Neurosci Lett**, v.524, p.119-23, 2012.
- LUI, C.C., et al. Effects of melatonin on prenatal dexamethasone-induced epigenetic alterations in hippocampal morphology and reelin and glutamic acid decarboxylase 67 levels. **Dev Neurosci**, v. 37, p. 105-114, 2015.
- LUNDWALL, K. *et al.* Paricalcitol, Microvascular and Endothelial Function in Non-Diabetic Chronic Kidney Disease: A Randomized Trial. **Am J Nephrol**, v. 42, n. 4, p. 265-273, outubro, 2015.
- MAIA-CECILIANO, T.C., et al. Maternal vitamin D-restricted diet has consequences in the formation of pancreatic islet/insulin-signaling in the adult offspring of mice. **Endocrine**, v. 54, p. 60-69, 2016.
- MANDL, M., et al. Differential glucocorticoid effects on proliferation and invasion of human trophoblast cell lines. **Reproduction**, v132, p.159-67, 2006.
- MANNA, P., JAIN, S.K. Vitamin D up-regulates glucose transporter 4 (GLUT4) translocation and glucose utilization mediated by cystathionine- $\gamma$ -lyase (CSE) activation and H<sub>2</sub>S formation in 3T3L1 adipocytes. **J Biol Chem**, v. 287, p. 42324-32, 2012.
- MARCOTORCHINO, J., et al. Vitamin D protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation. **J Nutr Biochem**, v.25, p.1077-83, 2014.
- MARK, P.J., et al. Rescue of glucocorticoid-programmed adipocyte inflammation by omega-3 fatty acid supplementation in the rat. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 13, p. 12-39, 2014.
- MATTHEWS, S. G. Antenatal glucocorticoids and programming of the developing CNS. **Pediatr. Res**, v. 47, p. 291–300, 2000.
- MICHELSON, D. Depression: body and brain. **Biol Psychiatry**, v. 66, p. 405- 406, 2009.
- MITRI, J., et al. Effects of vitamin D and calcium supplementation on pancreatic  $\beta$  cell function, insulin sensitivity, and glycemia in adults at high risk of diabetes: the Calcium and Vitamin D for Diabetes *Mellitus* (CaDDM) randomized controlled trial. **Am J Clin Nutr**, v.94, p.486-94, 2011.
- MOTTA, K., et al. Dexamethasone Administration During Late Gestation Has No Major Impact on Lipid Metabolism, but Reduces Newborn Survival Rate in Wistar Rats. **Front Physiol**, v.3, p.9:783, 2018.

NADAL, A., *et al.* The pancreatic b-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: implications for blood glucose homeostasis and diabetes. **Mol Cell Endocrinol.** v.304, p. 63-68, 2009.

NAGANO, M.; OZAWA, H.; SUZUKI, H. Pré-natal dexamethasone exposure affects anxiety-like behaviour and neuroendocrine systems in an age-dependent manner. **Neurosci. Res.** v. 60, p. 364–371, 2008.

NAGANO, M.; OZAWA, H.; SUZUKI, H. Pré-natal dexamethasone exposure affects anxiety-like behaviour and neuroendocrine systems in an age-dependent manner. **Neuroscience Research.** v.60, n.4, p.364-371, 2008.

NANDI, A. *et al.* Is there a role for vitamin D in human reproduction? **Horm Mol Biol Clin Investig.** v. 25, n. 1, p. 15-28, 2016.

NARVAEZ, C.J., *et al.* Lean phenotype and resistance to diet-induced obesity in vitamin D receptor knockout mice correlates with induction of uncoupling protein-1 in white adipose tissue. **Endocrinology**, v.150. p.651-61, 2009.

NEVE, A., CORRADO, A., CANTATORE, F.P. Immunomodulatory effects of vitamin D in peripheral blood monocyte-derived macrophages from patients with rheumatoid arthritis. **Clin Exp Med**, v. 14, p. 275-83, 2014.

NOORLANDER, C. W. *et al.* Pré-natal corticosteroid exposure affects hippocampal plasticity and reduces lifespan. **Dev. Neurobiol**, v. 68, p. 237–246, 2008.

NORMAN, A.W., *et al.* Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. **Science**, v. 209, p. 823-5, 1980.

NYIRENDA M.J. *et al.* Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. **The Journal of clinical investigation**, v. 101, p. 2174–2181, 1998.

NYIRENDA, M.J., *et al.* Pré-natal programming of metabolic syndrome in the common marmoset is associated with increased expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. **Diabetes.** v.58, n.12, p.2873-2879, 2009.

NYIRENDA, M.J., *et al.* Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. **Journal of Clinical Investigation.** v.101, p.2174-2181, 1998.

OBRADOVIC, D. *et al.* Cross-talk of vitamin D and glucocorticoids in hippocampal cells. **J Neurochem**, v. 96, p. 500- 509, 2006.

OBRADOVIC, D., *et al.* Cross-talk of vitamin D and glucocorticoids in hippocampal cells. *Journal of Neurochemistry* v.96, p.500–509, 2006.

O'LOAN, J., *et al.* Vitamin D deficiency during various stages of pregnancy in the rat; its impact on development and behaviour in adult offspring. *Psychoneuroendocrinology*, v. 32, p. 227-34, 2007.

OWEN, D.; MATTHEWS, S. G. Repeated maternal glucocorticoid treatment affects activity and hippocampal NMDA receptor expression in juvenile guinea pigs. *J. Physiol*, v. 578, p. 249–257 2007.

PAFFONI, A. *et al.* Vitamin D deficiency and infertility: insights from in vitro fertilization cycles. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 99, n. 11, p. E2372-2376, novembro, 2014.

PALOMER, X., *et al.* Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes *mellitus*. *Diabetes Obes Metab*, v. 10, p. 185-97, 2008.

PAN, P., *et al.* The effects of vitamin D<sub>3</sub> during pregnancy and lactation on offspring physiology and behavior in Sprague-Dawley rats. *Developmental Psychobiology*. v.56, n.1, p. 12-22, 2012.

PANTALEÃO, L.C., MURATA, G, TEIXEIRA, C.J., *et al.* Prolonged fasting elicits increased hepatic triglyceride accumulation in rats born to dexamethasone-treated mothers. *Sci Rep*. 4;7(1):10367, 2017.

PATRICK, R.P., AMES, B.N. Vitamin D hormone regulates serotonin synthesis. Part 1: relevance for autism. *FASEB J*. v.28, p.2398-413, 2014.

PAYOLLA, T.B., TEIXEIRA, C.J., SATO, F.T., *et al.* In Utero Dexamethasone Exposure Exacerbates Hepatic Steatosis in Rats That Consume Fructose During Adulthood. *Nutrients*. 11(9):2114, 2019.

PELLOW, S. *et al.* Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 14, p. 149-167, 1985.

PERRY, R.J., *et al.* The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, v. 510, p. 84-91, 2014.

PITTAS, A.G., *et al.* The effects of calcium and vitamin D supplementation on blood glucose and markers of inflammation in nondiabetic adults. *Diabetes Care*, v.30, p.980-6, 2007.

POPOLI, M. *et al.* The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat. Rev. Neurosci*, v. 13, p. 22–37, 2012.

POZZI, F., FRAJESE, G.V., FRAJESE, G. Vitamin D (calcifediol) supplementation modulates NGF and BDNF and improves memory function in postmenopausal women: a pilot study. **Endocrinology**, p.1–11, 2013.

PREMAOR, M.O. *et al.* Hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in resident physicians of general hospital in Southern Brazil. **J Endocrinol Investigation**, v. 31, n. 11, p. 991-995, 2008.

RAFACHO, A., *et al.* High doses of dexamethasone induce increased beta-cell proliferation in pancreatic rat islets. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, p. 681-9, 2009.

RAMOS, A. *et al.* A multiple-test study of anxiety-related behaviors in six inbred rat strains. **Behavioral Brain Research**, v. 85, p. 57-69, 1997.

RECOVERY Collaborative Group, Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M, Bell JL, Linsell L, Staplin N, Brightling C, Ustianowski A, Elmahi E, Prudon B, Green C, Felton T, Chadwick D, Rege K, Fegan C, Chappell LC, Faust SN, Jaki T, Jeffery K, Montgomery A, Rowan K, Juszczak E, Baillie JK, Haynes R, Landray MJ. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19 - Preliminary Report. **N Engl J Med**. NEJMoa2021436, 2020.

REYNOLDS, R. M. Glucocorticoid excess and the developmental origins of disease: two decades of testing the hypothesis—2012 Curt Richter Award Winner. **Psychoneuroendocrinology**, v.38, p. 1–11, 2013.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J.A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids - New Mechanisms for Old Drugs. **N Engl J Med**, v.353, p.1711-1723, 2005.

RIANT, E., *et al.* Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. **Endocrinology**, v. 150, p. 2109-17, 2009.

RODGERS, R. J. *et al.* Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Basilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 289-304, 1997.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21, p. 801-810, 1997.

RODGERS, R. J; JOHNSON, N.J.T. Factor Analysis of Spatiotemporal and Ethological Measures in the Murine Elevated Plus-Maze Test of Anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52, p. 297-303, 1995.

RODRIGUEZ, J. S. *et al.* Pré-natal betamethasone exposure has sex specific effects in reversal learning and attention in juvenile baboons. **Am. J. Obstet. Gynecol**, v. 204, n. 545, p.e1–545.e10, 2011.

SABIR, M.S., et al. Optimal vitamin D spurs serotonin: 1,25-dihydroxyvitamin D represses serotonin reuptake transport (*SERT*) and degradation (*MAO-A*) gene expression in cultured rat serotonergic neuronal cell lines. **Genes Nutr**, v.11, p.13:19, 2018.

SABLOK, A., et al. Supplementation of vitamin D in pregnancy and its correlation with fetomaternal outcome. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v.83, p.536-41, 2015.

SACTA, M.A.; CHINENOV, Y.; ROGATSKY, I. Glucocorticoid signaling: an update from a genomic perspective. **Annu Rev Physiol**, v. 78, p. 155–180, 2016.

SAHOO, S.K., et al. Maternal vitamin D supplementation in pregnancy and offspring outcomes: a double-blind randomized placebo-controlled trial. **J Bone Miner Metab**, v.35, p.464-471, 2017.

SANTOS, M. S.; JOLLES, J. A. Early determinants of cardiovascular disease. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 26, p. 581–597, 2012.

Santos-Silva JC, da Silva PMR, de Souza DN, Teixeira CJ, Bordin S, Anê GF. In utero exposure to dexamethasone programs the development of the pancreatic  $\beta$ - and  $\alpha$ -cells during early postnatal life. **Life Sci**.15;255:117810, 2020.

SAPOLSKY, R.M.; ROMERO, L.M.; MUNCK, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocr Rev**, v.21, p. 55–89, 2000.

SARNYAI, Z., et al. Impaired hippocampal-dependent learning and functional abnormalities in the hippocampus in mice lacking serotonin(1A) receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, p. 14731-6, 2000.

SAYEED, I., et al. Vitamin D deficiency increases blood-brain barrier dysfunction after ischemic stroke in male rats. **Exp Neurol**, v. 312, p. 63-71, 2019.

SCHÄCKE, H.; DÖCKE, W.D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacol Ther**, v. 96, p. 23–43, 2001.

SCHIMMER, B.; FUNDER, J. ACTH, Adrenal Steroids, and Pharmacology of the Adrenal Cortex. In: **Goodman & Gillman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**, New York, NY: McGraw-Hill, 2011

SCOTT, D.C., SCHEKMAN, R. Role of Sec61p in the ER-associated degradation of short-lived transmembrane proteins. **J Cell Biol**, v.181, p.1095-105, 2008.

SHIPTON, E.A.; SHIPTON, E.E. Vitamin D and Pain: Vitamin D and Its Role in the Aetiology and Maintenance of Chronic Pain States and Associated Comorbidities. **Pain Res Treat**, v. 2015, n.1, p. 904967, abril, 2015.

SLOTKIN, T.A., *et al.* Critical pré-natal and postnatal periods for persistent effects of dexamethasone on serotonergic and dopaminergic systems. **Neuropsychopharmacol**, v. 31, p. 904–911, 2006.

SLOTKIN, T.A., *et al.* Critical prenatal and postnatal periods for persistent effects of dexamethasone on serotonergic and dopaminergic systems. **Neuropsychopharmacology**, v.31, p.904-11, 2006.

SLOTKIN, T.A., *et al.* Prenatal dexamethasone augments the sex-selective developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: implications for vulnerability after pharmacotherapy for preterm labor. **Neurotoxicol Teratol**, v.37, p.1-12, 2013.

SOMM, E., *et al.* Early Metabolic Defects in Dexamethasone-Exposed and Undernourished Intrauterine Growth Restricted Rats. **PLoS ONE**. v.7, n.11, p.50131, 2012.

SOMM, E., *et al.* Early metabolic defects in dexamethasone-exposed and undernourished intrauterine growth restricted rats. **PLoS One**, v. 7, e50131, 2012.

STAHN, C.; BUTTGEREIT, F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. **Nat Clin Pract Rheumatol**, v. 4, p. 525–533, 2008.

STROBEL, F., *et al.* Effect of a randomised controlled vitamin D trial on insulin resistance and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes *mellitus*. **Horm Metab Res**, v.46, p.54-8, 2014.

TAMILSELVAN, B., SESHADRI, K.G., VENKATRAMAN, G. Role of vitamin D on the expression of glucose transporters in L6 myotubes. **Indian J Endocrinol Metab**, v. 17, p. 326-8, 2013.

TRUJILLO, M.L., *et al.* Hyperphagia and central mechanisms for leptin resistance during pregnancy. **Endocrinology**, v.152, p.1355-65, 2011.

TSAI, C.C., *et al.* Obesity programmed by prenatal dexamethasone and postnatal high-fat diet leads to distinct alterations in nutrition sensory signals and circadian-clock genes in visceral adipose tissue. **Lipids Health Dis**, v.18, p.19, 2019.

ULRICH-LAI, Y.M., HERMAN, J.P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nat Rev Neurosci**, v.10, p.397-409, 2009.

Uno, H., *et al.* Brain damage induced by prenatal exposure to dexamethasone in fetal rhesus macaques. I. Hippocampus. **Brain Res Dev Brain Res**, v.53, p.157-67, 1990.

VALTAT, B., *et al.* Genetic evidence of the programming of beta cell mass and function by glucocorticoids in mice. **Diabetologia**, v.54, p.350-9, 2011.

Van BEL, F.; HEIJNEN, C. J. Perinatal programming and reprogramming by glucocorticoid therapy and perinatal stress. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, v. 14, n. 3, p. 127–129, 2009.

VEENA, S.R., et al. Association between maternal vitamin D status during pregnancy and offspring cognitive function during childhood and adolescence. *Asia Pac J Clin Nutr*, v. 26, p. 438-449, 2017.

VEENSTRA, T.D. *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors in the central nervous system of the rat embryo. *Brain Res*, v. 804, p. 193–205, 1998.

VELÍSEK, L. Pré-natal exposure to betamethasone decreases anxiety in developing rats: hippocampal neuropeptide y as a target molecule. *Neuropsychopharmacology*. v.31, n.10, p.2140-2149, 2006.

VUILLERMOT, S., *et al.* Vitamin D treatment during pregnancy prevents autism-related phenotypes in a mouse model of maternal immune activation. *Molecular Autism*. v.8, n.1, 2017.

VUILLERMOT, S., et al. Vitamin D treatment during pregnancy prevents autism-related phenotypes in a mouse model of maternal immune activation. *Mol Autism*, v. 7, p. 8-9, 2017.

WALLENSTEEN, L., et al. Sex-Dimorphic Effects of Prenatal Treatment With Dexamethasone. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 101, p. 3838-3846, 2018.

WANG, S.H., et al. Decreased expression of serotonin 1A receptor in the dentate gyrus in association with chronic mild stress: a rat model of post-stroke depression. *Psychiatry Res*, v. 170, p.245-51, 2009.

WANG. C., *et al.* Impairment of object recognition memory by maternal bisphenol A exposure is associated with inhibition of Akt and ERK/CREB/BDNF pathway in the male offspring hippocampus. *Toxicology*. v. 341, n.343, p. 56-64, 2016.

WEINSTOCK, M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev*. v.32, p. 1073-86, 2008.

WELBERG, L. A.; SECKL, J.; HOLMES, M. Pré-natal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications for behaviour. *Neuroscience*. v.104, n.1, p.71-79, 2001.

WITHAM, M.D., et al. The effect of different doses of vitamin D(3) on markers of vascular health in patients with type 2 diabetes: a randomised controlled trial. *Diabetologia*, v.53, p.2112-9, 2010.

WRZOSEK, M. *et al.* Vitamin D and the central nervous system. **Pharmacol Rep**, v. 65, p. 271–278, 2013.

WYRWOLL, C.S., *et al.* Developmental programming of adult hyperinsulinemia, increased proinflammatory cytokine production, and altered skeletal muscle expression of SLC2A4 (GLUT4) and uncoupling protein 3. **J Endocrinol**, v. 198, p. 571-9, 2008.

YALOW, R. Radioimmunoassay: a probe for the fine structure of biologic systems. **Science**, p. 1236–1245, 1978.

YAO, W. *et al.* Glucocorticoid excess in mice results in early activation of osteoclastogenesis and adipogenesis and prolonged suppression of osteogenesis: a longitudinal study of gene expression in bone tissue from glucocorticoid-treated mice. **Arthritis Rheum**, v.58, p. 1674–1686, 2008.

ZEROFSKY, M.S., *et al.* Daily Cholecalciferol Supplementation during Pregnancy Alters Markers of Regulatory Immunity, Inflammation, and Clinical Outcomes in a Randomized Controlled Trial. **J Nutr**, v.146, p.2388-2397, 2016.

ZHANG, M.X. *et al.* Vitamin D Deficiency Increases the Risk of Gestational Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis of Observational Studies. **Nutrients**, v. 7, n.10, p. 8366–8375, 2015.

ZHOU, L., *et al.* Folate ameliorates dexamethasone-induced fetal and placental growth restriction potentially via improvement of trophoblast migration. **Int J Clin Exp Pathol**, v.8, p.3008-14, 2015.

ZHU, P. *et al.* Cord blood vitamin D and neurocognitive development are nonlinearly related in toddlers. **J Nutr**, v.145, n. 6, p. 1232-1238, junho, 2015.

ZUENA, A.R., *et al.* Prenatal restraint stress generates two distinct behavioral and neurochemical profiles in male and female rats. **PLoS One**, v. 3, e2170, 2008.

ZULOAGA, D. G. *et al.* Perinatal dexamethasone-induced alterations in apoptosis within the hippocampus and paraventricular nucleus of the hypothalamus are influenced by age and sex. **J. Neurosci Res**, v. 90, p. 1403–1412, 2012.

## 8. ANEXO

### 8.1. Certificado de aprovação CEUA-UFSC



Universidade Federal  
de Santa Catarina

Comissão de Ética no  
Uso de Animais



#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo dos efeitos da administração de dexametasona durante a gravidez sobre a cognição, o comportamento e metabolismo energético de ratos Wistar e suas proles. ", protocolada sob o CEUA nº 7174170417, sob a responsabilidade de **Fernanda Barbosa Lima Christian e equipe; Flaviano Lorenzon** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 05/06/2017.

We certify that the proposal "Study of the effects of dexamethasone used during pregnancy on cognition, behavior and metabolism of Wistar female rats and their offsprings.", utilizing 370 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 7174170417, under the responsibility of **Fernanda Barbosa Lima Christian and team; Flaviano Lorenzon** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 06/05/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de **06/2017** a **06/2021** Área: [Ciências Fisiológicas](#)

Origem: [Biotério Central](#)  
 Espécie: [Ratos heterogênicos](#) sexo: [Machos e Fêmeas](#) idade: [1 a 2 meses](#) N: [370](#)  
 Linhagem: [Wistar](#) Peso: [100 a 200 g](#)

Resumo: Os glicocorticoides (GCs) são hormônios importantes para o desenvolvimento fetal, além de participarem da homeostase glicêmica e da resposta adequada ao estresse ao longo da vida. Porém, seu uso na clínica como droga anti-inflamatória e imunossupressora tem provocado efeitos colaterais que incluem alterações do metabolismo que podem levar à síndrome metabólica, bem como a doenças cardiovasculares, osteoporose e transtornos psíquicos. A exposição pré-natal a concentrações elevadas de GC tem efeitos deletérios na prole, podendo leva-los à morte, ou, em caso de sobrevivência, a danos metabólicos e neurais que repercutem em diversas áreas na vida adulta. A vitamina D tem sido sugerida como um tratamento coadjuvante para amenizar os efeitos colaterais dos glicocorticoides, principalmente no que tange a osteoporose, visto a sua participação na homeostase do cálcio e fósforo. Recentemente a vitamina D tem sido sugerida como um hormônio pluripotente com atividade em diversos sistemas, incluindo o sistema nervoso central, participando inclusive no desenvolvimento do cérebro fetal. A deficiência de vitamina D está se tornando cada vez mais frequente em mulheres em idade reprodutiva. Por um lado, poucos alimentos contêm quantidades adequadas ou são suplementados com vitamina D para suprir as necessidades dietéticas diárias. Por outro as altas taxas de incidência de tumores cutâneos devido à alta exposição solar têm levado a comportamentos de evitar a exposição ao sol e ao uso de filtros de proteção solar. Com isso, a síntese endógena de vitamina D é prejudicada, contribuindo para deficiência da mesma. Os conhecidos efeitos deletérios dos glicocorticoides administrados na gravidez levam a prole a desenvolver desordens metabólicas similares àquelas encontradas na diabetes e obesidade, bem como levam a mãe a desenvolver desordens psíquicas que podem interferir nas funções cognitivas, afetando o cuidado com a prole e levando às neuropatias associadas. Nós hipotetizamos que a suplementação de vitamin D durante a gravidez de ratas expostas a altas doses de dexametasona, uma droga com potente ação glicocorticoide, poderá reverter, ou ao menos atenuar os efeitos deletérios dos glicocorticoides tanto nas gestantes quanto na prole de ratos Wistar. Nossa proposta visa estudar ainda se a prole apresenta diferenças sexuais na susceptibilidade aos efeitos da dexametasona e ou nas respostas à intervenção com vitamin D. O trabalho será realizado com ratas Wistar com 70-150 dias e machos adultos para o protocolo de acasalamento (com duração de 6 dias). Parte das fêmeas prenhes receberão suplementação de vitamina D via oral, por gavagem (15 UI) durante todo o período gestacional e/ou dexametasona nas doses de 0,1 e 0,2 mg/kg na da água de beber, entre o 14º e 19º dia de gestação. Após o parto, as fêmeas serão submetidas aos seguinte testes comportamentais: teste de comportamento materno, onde serão avaliados a condução dos filhotes até o ninho, amamentação e ato de lambar os filhotes; teste do ninho, onde o grau de complexidade do ninho construído será avaliado; labirinto

reconhecimento de objetos, para avaliação da cognição e memória dos animais. As proles serão avaliadas desde o período pré-natal com relação a parâmetros de desenvolvimento neural, testes comportamentais como os aplicados nas mães, bem como dados murinométricos e parâmetros metabólicos tais como níveis plasmáticos de glicose e triacilglicerol, conteúdo de gordura

Rua Desembargador Vitor Lima, 222, sala 401 - Trindade - Florianópolis/Santa Catarina-SC CEP: 88040-400 - tel: 55 (48) 3721-6093 / fax: -  
Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 8h às 12h e das 14h às 18h : e-mail: ceua.propesq@contato.ufsc.br  
CEUA N 7174370417



**Universidade Federal  
de Santa Catarina**

**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**



hepática, tolerância à insulina, massa de células  $\beta$  pancreáticas e massas absoluta e relativa de órgãos metabólicos.

Local do experimento: CFS-CCB-UFSC, (na ala antiga do CCB, no antigo prédio da Técnica Operatório) com aproximadamente 6 m<sup>2</sup> cada sala de animais.

Florianópolis, 05 de junho de 2017

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Catarina

Maria Alcina Martins de Castro  
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Catarina